

Patent number  
No. 2975603

(19)日本国特許庁 (JP)

## (12) 特許公報 (B2)

(11)特許番号

第2975603号

(45)発行日 平成11年(1999)11月10日

(24)登録日 平成11年(1999)9月3日

(51)Int.Cl.<sup>a</sup>  
C 12 N 15/09  
C 12 Q 1/68識別記号  
ZNAF I  
C 12 N 15/00  
C 12 Q 1/68Issue date  
ZNAA  
A

Application No.

発明の数5(全28頁)

(21)出願番号 特願昭62-268030

(22)出願日 昭和62年(1987)10月23日

(65)公開番号 特開昭63-188399

(43)公開日 昭和63年(1988)8月3日

審査請求日 平成6年(1994)6月2日

(31)優先権主張番号 922155

(32)優先日 1986年10月23日

(33)優先権主張国 米国(US)

(73)特許権者 99999999

ヴァイシス・インコーポレーテッド  
アメリカ合衆国イリノイ州60515-5400,  
ダウナーズ・グローブ、ウッドクリー

ク・ドライブ 3100

(72)発明者 マーク・レオ・コリンズ

アメリカ合衆国マサチューセッツ州  
01520, ホールデン, マルデン・ストリ  
ート 435

(74)代理人 弁理士 村本一夫(外5名)

審査官 内田俊生

(56)参考文献 特開昭60-93355 (JP, A)  
特開昭60-237361 (JP, A)  
高木康敬編「遺伝子操作実験法」(第  
3刷)株式会社講談社(1981年7月1  
日) p. 30-32

(54)【発明の名称】 標的およびバツクグラウンド捕獲法ならびにアフィニティ検定用装置

1

2

## (57)【特許請求の範囲】

1. 試料中の標的核酸を試料中の非標的核酸から分離する方法であって、

(a) 試料を、標的と結合してプローブー標的複合体を形成するが非標的核酸と結合しない第1の核酸プローブを含む試薬と接触させ；

(b) 工程(a)の試料を、プローブー標的複合体の第1の核酸プローブと結合する支持体と接触させ；

(c) 支持体および結合したプローブー標的複合体を試料から実質的に分離し；

(d) 支持体および結合したプローブー標的複合体を第2の媒体と接触させ；

(e) 標的を、支持体および結合した第1の核酸プローブから放出させ；そして

(f) 支持体および結合した第1の核酸プローブを、

標的が第2の媒体中に残るように第2の媒体から実質的に分離する；

の各工程を含む方法。

2. 支持体が、試料および第2の媒体のそれぞれに実質的に分散している、特許請求の範囲第1項に記載の方法。

3. 支持体がビーズを含む、特許請求の範囲第1項に記載の方法。

4. ビーズが磁性である、特許請求の範囲第3項に記載の方法。

5. さらに、

(a) 前記第2の媒体を、標的と結合してプローブー標的複合体を形成する追加の第1の核酸プローブと接触させ；

(b) 第2の媒体を、プローブー標的複合体の第1の

10

核酸プローブと結合する追加の支持体と接触させ；そして

(c) 支持体および結合したプローブー標的複合体を実質的に分離する；

の各工程を含む、特許請求の範囲第1項に記載の方法。

6. さらに、

(a) 前記支持体および結合したプローブー標的複合体を第3の媒体と接触させ；

(b) 標的を、支持体および結合した第1の核酸プローブから放出させ；そして

(c) 支持体および結合した第1の核酸プローブを第3の媒体から実質的に分離する；

の各工程を含む、特許請求の範囲第5項に記載の方法。

7. 支持体が、試料ならびに第2および第3の媒体中に実質的に分散している、特許請求の範囲第6項に記載の方法。

8. 支持体が磁性ビーズを含む、特許請求の範囲第7項に記載の方法。

9. さらに、標的捕獲および放出の少なくとも1つの追加のサイクルを含む、特許請求の範囲第6項に記載の方法。

10. 試料中の標的核酸の存在を検出する方法であつて、

(a) 試料を、標的と結合してプローブー標的複合体を形成する第1の核酸プローブを含む試薬と接触させ；

(b) 工程(a)の試料を、プローブー標的複合体の第1の核酸プローブと結合する支持体と接触させ；

(c) 支持体および結合したプローブー標的複合体を試料から実質的に分離し；

(d) 支持体および結合したプローブー標的複合体を第2の媒体と接触させ；

(e) 標的を、支持体および結合した第1の核酸プローブから放出させ；

(f) 支持体および結合した第1の核酸プローブを、標的が第2の媒体中に残るように、第2の媒体から実質的に分離し；そして

(g) 第2の媒体中に存在する標的の存在を検出する；

の各工程を含む方法。

11. 標的核酸について試料を検定する方法であつて、

(a) 試料を、標的と結合してプローブー標的複合体を形成する第1の核酸プローブおよび少なくとも1つの第2の核酸プローブを含む試薬と接触させ；

(b) 工程(a)の試料を、プローブー標的複合体の第1の核酸プローブと結合する支持体と接触させ；

(c) 支持体および結合したプローブー標的複合体を試料から実質的に分離し；

(d) 支持体および結合したプローブー標的複合体を第2の媒体と接触させ；

(e) プローブー標的複合体を第2の媒体中に放出さ

せ；

(f) 支持体を第2の媒体から実質的に分離し；そして

(g) プローブー標的複合体を、標的の存在を示す第2の核酸プローブの存在について監視する；

の各工程を含む方法。

12. 前記第2の核酸プローブが標識を含む、特許請求の範囲第11項記載の方法。

13. 支持体が前記試料および前記第2の媒体中に実質的に分散している、特許請求の範囲第11項に記載の方法。

14. 前記支持体がビーズを含む、特許請求の範囲第11項に記載の方法。

15. 前記ビーズが磁性である、特許請求の範囲第14項に記載の方法。

16. さらに、

(a) 第2の媒体を、プローブー標的複合体の第1の核酸プローブと結合する追加の支持体と接触させ；そして

(b) 前記支持体および結合したプローブー標的複合体を前記第2の媒体から実質的に分離する；

の各工程を含む、特許請求の範囲第11項に記載の方法。

17. さらに、

(a) 前記支持体および結合したプローブー標的複合体を第3の媒体と接触させ；

(b) プローブー標的複合体を第3の媒体中に放出させ；そして

(c) 前記支持体を前記第3の媒体から実質的に分離する；

の各工程を含む、特許請求の範囲第16項に記載の方法。

18. 追加の支持体が、第2の媒体および第3の媒体のそれぞれに実質的に分散している、特許請求の範囲第17項に記載の方法

19. さらに、プローブー標的複合体の捕獲および放出の追加のサイクルを含む、特許請求の範囲第17項に記載の方法。

20. 試料中の標的核酸を試料中の非標的核酸から分離するためのキットであつて、前記分離プロセスは、

(a) 試料を、標的と結合してプローブー標的複合体を形成するが非標的核酸と結合しない第1の核酸プローブを含む試薬と接触させ；

(b) 工程(a)の試料を、プローブー標的複合体の第1の核酸プローブと結合する支持体と接触させ；

(c) 支持体および結合したプローブー標的複合体を試料から実質的に分離し；

(d) 支持体および結合したプローブー標的複合体を第2の媒体と接触させ；

(e) 標的を、支持体および結合した第1の核酸プローブから放出させ；そして

(f) 支持体および結合した第1の核酸プローブを、

標的が第2の媒体中に残るように、第2の媒体から実質的に分離する；

の各工程を含む方法により実施され、前記キットは、

(i) 標的と結合してプローブー標的複合体を形成するが非標的核酸には結合しない第1の核酸プローブを含む試薬；

(ii) プローブー標的複合体の第1の核酸プローブと結合する支持体；および

(iii) 標的を第1の核酸プローブおよび支持体から放出させるための試薬；

を含むキット。

21. 第2の媒体中に存在する標的の存在を検出するための試薬をさらに含む、特許請求の範囲第20項記載のキット。

22. 第2の媒体中に存在する標的の存在を検出するための第2のプローブをさらに含む、特許請求の範囲第20項記載のキット。

23. 試料中の標的核酸の存在を検出する方法であつて、

(a) 試料を、標的と結合して支持体および会合したプローブー標的複合体を形成する第1の核酸プローブに会合した支持体を含む試薬と接触させ；

(b) 支持体および会合したプローブー標的複合体を試料から実質的に分離し；

(c) 支持体および会合したプローブー標的複合体を第2の媒体と接触させ；

(d) 標的を支持体から、および会合した第1の核酸プローブを第2の媒体から放出せ；

(e) 支持体および会合した第1の核酸プローブを、標的が第2の媒体中に残るように、第2の媒体から実質的に分離し；そして

(f) 第2の媒体中に存在する標的の存在を検出する；

の各工程を含む方法。

24. 支持体がビーズを含む、特許請求の範囲第23項記載の方法。

#### 【発明の詳細な説明】

##### (産業上の利用分野)

本発明は、標的分子の捕獲に使用するための方法、試薬、組成物、キットおよび装置に関する。詳しくは、本発明は臨床試料からデオキシリボ核酸(DNA)またはリボ核酸(RNA)を捕獲するための方法、試薬、組成物およびキットに関する。本発明の態様は、非放射性標識技術および自動化に適合しうる臨床試料中の標的核酸の迅速かつ高感度の検出方法を提供する。

##### (従来の技術)

以下の定義は本発明を理解しやすくするために提供される。本明細書で用いる“生物学的結合対”なる用語は、自然親和力または結合能を示すあらゆる分子対を意味する。本明細書で用いる“リガンド”なる用語は、生

物学的結合対の1つの分子を指し、そして“抗リガンド”または“レセプター”なる用語は、生物学的結合対の他方の分子を指す。例えば、制限するものでないが、本発明の態様は生物学的結合対が2本の相補的なポリ核酸鎖である核酸ハイブリダイゼーション検定に適用される。ポリ核酸鎖の一方はリガンドと呼ばれ、他方は抗リガンドと呼ばれる。しかしながら、生物学的結合対には抗原と抗体、薬物と薬物レセプター部位、および酵素と酵素基質が含まれる。

10 “プローブ”なる用語は、標的抗リガンドと選択的に結合しうる既知性質のリガンドを意味する。核酸に適用するとき、“プローブ”は標的鎖に相補的な塩基配列をもつ核酸鎖を指す。

“標識”なる用語は検出可能な分子成分を意味し、例えれば制限するものでないが、放射性同位体、酵素、発光物質、および染料を包含する。“試薬”なる用語は広義に使用され、検出可能な応答へ導く反応に関与するあらゆる分子成分を含む。“コファクター(補助因子)”なる用語は、試薬との反応に関与するあらゆる分子成分を含み、広い意味で使用される。

“回収可能”なる用語は、媒体中に実質的に分散でき且つ固定化、過、分配などによりその媒体から分離しうる物質を説明するために広い意味で使用される。

“支持体”なる用語は、単独で使用する場合、フィルターや膜のような慣用支持体ならびに回収可能な支持体を包含する。

リガンドと抗リガンドの結合に関して“可逆的”なる用語は、リガンドと抗リガンドの全体的な化学的性質を永久に変えることのない変化を加える際に、結合または解離しうることを意味する。例えば制限するものではないが、可逆的結合はリガンドや抗リガンドを破壊しないpH、温度およびイオン強度の変化により制御されるこの種の結合および解離を包含するであろう。遺伝情報は生細胞中の糸状のDNA分子に貯えられる。生体内において、DNA分子は二重らせん構造をしており、それぞれのDNA鎖はヌクレオチドの鎖である。各ヌクレオチドは4種の塩基：すなわちアデニン(A)、グアニン(G)、チミン(T)、およびシトシン(C)のうちの1種により特徴づけられる。これらの塩基は、官能基の向きにより、ある種の塩基対が引きつけ合つて水素結合により結合するという意味で相補的である。一方のDNA鎖中のアデニンは他方の相補鎖中のチミンと対合する。一方のDNA鎖中のグアニンは他方の相補鎖中のシトシンと対合する。RNAでは、チミン塩基がウラシル(U)によって置換され、ウラシルは他方の相補鎖中のシトシンと対合する。

50 DNAは共有結合されたデオキシリボヌクレオチド鎖から成り、そしてRNAは共有結合されたりボヌクレオチド鎖から成る。生物の遺伝暗号は塩基対の配列中のDNA鎖に担持される。

それぞれの核酸は、1つのヌクレオチドの糖の5' ヒドロキシル基と隣接ヌクレオチドの糖の3' ヒドロキシル基との間のホスホジエステル結合により結合される。自然界に存在するDNAまたはRNAのそれぞれの線状鎖は、遊離の5' ヒドロキシル基をもつ1つの末端と3' ヒドロキシル基をもつもう1つの末端を有する。ポリヌクレオチドの末端はそれぞれの遊離ヒドロキシル基に関連して5' 末端または3' 末端と呼ばれる。DNAおよびRNAの相補鎖は、一方の鎖の3' 末端が他方の鎖の5' 末端に配向および結合して逆平行複合体を形成している。

核酸ハイブリダイゼーション検定は、2本の核酸鎖が相補領域で対合する性質に基づいている。現在、核酸ハイブリダイゼーション検定は完全なDNA分子、核酸混合物または核酸フラグメント混合物中に存在する唯一のDNAまたはRNA塩基配列もしくは特定遺伝子を検出および同定するために主として使用されている。

組織または培養試料から抽出された全DNAまたはRNA中の唯一のDNAまたはRNA配列もしくは特定遺伝子の同定は、生理学的または病理学的症状の存在を示す。特に、ヒトまたは動物組織から抽出された全DNAまたはRNA中の唯一のDNAまたはRNA配列もしくは特定遺伝子の同定は錐状赤血球貧血のような遺伝病、組織適合性、癌および前癌状態、または細菌やウイルス感染の存在を示す。細菌培養物または細菌を含む組織から抽出された全DNAまたはRNA中の唯一のDNAまたはRNA配列もしくは特定遺伝子の同定は抗生物質耐性、毒素、ウイルスまたはプラスミドの存在を示し、また細菌型の同定をもたらす。

従つて、核酸ハイブリダイゼーション検定は病気の診断および検査において大きな可能性を持つている。さらに、核酸ハイブリダイゼーション検定が植物の病因または毒素産生細菌を検出するために使用される農業および食品加工の分野においてもその可能性が存在する。

最も広く使用される核酸ハイブリダイゼーション検定法の1つは、サザンプロットフィルターハイブリダイゼーション法またはただ単にサザン法として知られるものである (Southern, E., J. Mol. Biol. I, 98, 503, 1975を参照されたい)。サザン法は標的DNAまたはRNA配列を同定するために使用される。この方法は一般にRNAまたはDNA試料をニトロセルロースシートに固定することにより行われる。固定化RNAまたはDNA試料は、標的配列に相補的な塩基配列を有しかつ検出可能な放射性成分を含む放射性標識プローブDNA鎖と接触させ、プローブとDNA試料とのハイブリダイゼーション（ハイブリッド形成）を起こさせる。

ハイブリダイゼーション法は一般に極めて特異的である。もしも標識プローブとDNAまたはRNA試料とが実質的に相補的な塩基対機構を共有しないならば、これらの2本のヌクレオチド鎖は結合しないであろう。ハイブリダイゼーションは所定の条件に応じて3~48時間要する。

しかしながら、実際問題として、検出の際に“バツクグラウンドノイズ (background noise)”として現われる標識プローブと支持体の非特異的結合が常に存在する。バツクグラウンドノイズは検定感度を低減させる。ハイブリダイズされないDNAプローブはその後洗い落とされる。ニトロセルロースシートはX線フィルムのシート上に置いて露光される。X線フィルムはフィルムの露光面を現像して、DNAプローブとハイブリダイズするが故に目的の塩基対配列をもつDNAフラグメントを同定する。

サザン検定法と共に放射性標識剤を使用することにより、核酸検定を臨床試料に応用することが可能になった。放射性崩壊は無関係のタンパク質および有機物質を含む臨床試料においてさえも検出可能である。しかしながら、無関係のタンパク質および有機物質の存在は、プローブと支持体の非特異的結合の一因になる。さらに、放射性標識技術の使用は、X線フィルム上のバンドを視覚化するために長時間の露出を必要とする。一般的なサザン法では露出のために1~7日を要する。さらに、放射性標識剤の使用は特別の実験室手段およびライセンスが必要である。

放射性同位元素標識を使用する検定に関連した上記の諸問題点は、非同位元素標識を使用する技術の開発へ導いた。非同位元素標識の例には酵素、発光剤および染料が含まれる。発光標識は外部エネルギー源による励起の際に光を発し、励起エネルギー源に応じて次の種類：すなわち高エネルギー粒子からエネルギーを得る放射線発光標識；化学反応からエネルギーを得る化学発光標識；励起エネルギーが生物学的系に適用される生物発光標識；および赤外線、可視光線または紫外線の電磁線（フォトン）単位により励起にしうるフォトルミネッセンスまたは螢光標識；に類別される。一般には、スミス (Smith) ら、*Ann.Clin.Biochem.*, 18:253, 274 (1981) を参照されたい。

非放射性エネルギー源により励起可能な標識を使用する非同位元素検定法は、放射性同位元素標識を使用する検定法に伴う健康への危険性およびライセンスの問題が回避される。さらに、非同位元素検定法はX線フィルムの使用に伴う長時間露出を避けて迅速な検出が保証されている。

しかしながら、非同位元素検定は信頼しうると見なすに足る感度または検定特異性を持つていなかつた。発光検定では、生物学的試料中に含まれるタンパク質および他の分子の存在が励起光線の散乱を起こし、発光標識の発光スペクトル中の光を吸収して発光プローブの消光をもたらす。

酵素検定では、生物学的試料中に含まれるタンパク質および他の分子の存在が酵素活性を阻害する。

同様に、比色定量検定では、生物学的試料に含まれるタンパク質および他の物質のために色の変化が検出でき

ない。

本発明の態様は、支持体および磁性粒子を含めた回収可能な支持体上での標的およびバツクグラウンドの捕獲に関する。磁性粒子はDNA、RNA、ポリペプチドおよび一定の配列をもつ多重単位分子のようなオリゴマーを含む有機化合物の合成用支持体として提案された。例えば、スチーブン・エー・ベンナー (Steven A.Benner) およびジェネティックス・インスチチュート (Genetics Institute) の欧州特許出願第83112493.8号明細書を参照されたい。しかしながら、磁性粒子は標的捕獲およびバツクグラウンド除去のための回収可能な支持体として提案されたことはなかった。

磁性粒子の他の利用には血液中の磁性流体、ノイバウアー (R.Neubauer) 、IEEE transactions on magnetics MAG-9、445 (1973) を参照；生体分子の分離のための官能基の結合、ギアバー (I.Giaver) の米国特許第3970518号明細書を参照；細胞表面レセプターの標識付け、マーゲル (S.Margel) ら、Jour.Imm.Meth. 28:28:34 1~53 (1979) を参照；治療中の磁性目標にするための薬物への結合、センアイ (A.Senyei) ら、J.App.Phys. 49 (6) :3578 (1978) 、ウイーダー (K.Wieder) ら、Proc.Soc.of Exp.Bio.Med. ,58:141 (1978) 、モツバツハ (K.Mosbach) およびシュレーダー (U.Shroeder) 、FEB S letters102:112 (1979) を参照；ウイルス、細菌および他の細胞の選択的分離、モルデー (R.Molday) ら、Nature 268:438 (1977) を参照；および生物学的重合体用のゲルアフィニティクロマトグラフイーにおける担体としての磁性粒子の使用、モスバツハ (K.Mosbach) およびアンダーソン (L.Anderson) 、Nature 270:359 (1977) を参照；が含まれ、上記の文献は参考によりここに引用される。

慣用の回収不可能な支持体上での標的の捕獲をもたらす2プローブ系の使用は、Nucleic Acids Research.14 (12) :5037 (1986) 、“アフィニティーに基づくハイブリット捕集による核酸ハイブリットの迅速定量化 (Fast Quantification of Nucleic Acid Hybrids by Affinity-Based Hybrid Collection)”と題するアンクリスチン・シュエン (Ann-Christine Syunen) 、マツチ・ラーカソネン (Matti Laaksonen) およびハンス・セダーランド (Hans Sderlund) により著された文献中で提案された。

#### (発明の概要)

本発明は、試料中の標的核酸を試料中の非標的核酸から分離する方法を提供する。この方法は、

- (a) 試料を、標的と結合してプローブー標的複合体を形成する第1の核酸プローブを含む試薬と接触させ；
- (b) 試料を、プローブー標的複合体の第1の核酸プローブと結合する支持体と接触させ；
- (c) 支持体および結合したプローブー標的複合体を試料から実質的に分離し；

(d) 支持体および結合したプローブー標的複合体を第2の媒体と接触させ；

(e) 標的を、支持体および結合した第1の核酸プローブから放出させ；そして

(f) 支持体および結合した第1の核酸プローブを、標的が第2の媒体中に残るように第2の媒体から実質的に分離する；

の各工程を含む。

本発明はまた、試料中の標的核酸の存在を判定する方法を提供する。この方法は、

(a) 試料を、標的と結合してプローブー標的複合体を形成する第1の核酸プローブを含む試薬と接触させ；

(b) 試料を、プローブー標的複合体の第1の核酸プローブと結合する支持体と接触させ；

(c) 支持体および結合したプローブー標的複合体を試料から実質的に分離し；

(d) 支持体および結合したプローブー標的複合体を第2の媒体と接触させ；

(e) 標的を、支持体および結合した第1の核酸プローブから放出させ；

(f) 支持体および結合した第1の核酸プローブを、標的が第2の媒体中に残るように、第2の媒体から実質的に分離し；そして

(g) 第2の媒体中に存在する標的の存在を検出する；

の各工程を含む。

本発明はまた、標的核酸について試料を検定する方法を提供する。この方法は、

(a) 試料を、標的と結合してプローブー標的複合体を形成する第1の核酸プローブおよび少なくとも1つの第2の核酸プローブを含む試薬と接触させ；

(b) 試料を、プローブー標的複合体の第1の核酸プローブと結合する支持体と接触させ；

(c) 支持体および結合したプローブー標的複合体を試料から実質的に分離し；

(d) 支持体および結合したプローブー標的複合体を第2の媒体と接触させ；

(e) プローブー標的複合体を第2の媒体中に放出させ；

(f) 支持体を第2の媒体から実質的に分離し；そして

(g) プローブー標的複合体を、標的の存在を示す第2の核酸プローブの存在について監視する；

の各工程を含む。

さらに本発明は、

(i) 標的と結合してプローブー標的複合体を形成するが非標的核酸には結合しない第1の核酸プローブを含む試薬；

(ii) プローブー標的複合体の第1の核酸プローブと結合する支持体；および

(iii) 標的を第1の核酸プローブおよび支持体から放出させるための試薬；  
を含む、試料中の標的核酸を試料中の非標的核酸から分離するためのキットを提供する。

本発明の目的は、対象となる標的分子について検定を行うための方法、試薬、組成物、キットおよび装置を提供することである。他の目的は以後に提示されるであろう。便宜上、制限するものではないが、本発明の態様は標的捕獲、バツクグラウンド捕獲、およびこれらの組合せの分野に分けることができる。

最初に標的捕獲について述べると、本発明の態様は標的分子を分離するための捕獲／放出サイクルを特徴とする。この方法は標的分子を含む可能性のある試料媒体を、プローブおよび第1支持体（結合条件下で少なくとも1つのプローブと会合した又は会合しうる支持体）と接触させることを含む。プローブは標的分子と選択的にかつ可逆的に結合して、プローブ、標的分子および回収可能な第1支持体から成る複合体を形成することができる。次に、支持体は試料媒体から分離して第2媒体と接触させる。その後、支持体を放出条件に付して支持体から標的分子を放出させ、そして支持体を第2媒体から分離する。次いで、第2支持体を結合条件下に上記の第2媒体と接触させる。第2支持体は標的分子と選択的に結合しうる少なくとも1つのプローブと会合されるか、又は会合することができる。結合条件下で、標的分子はその後の処理のために第2支持体に会合したプローブと複合体を形成する。

好ましくは、第1支持体は試料媒体中に実質上均質に分散でき且つ試料媒体から物理的に分離・回収でき、あるいは試料媒体中で固定化しうるという意味で回収可能である。

第1媒体からの第1支持体の分離は、第1支持体に非特異的に結合した細胞破片を除去する。さらに、第2支持体への標的分子の結合は、検出のために標的分子を濃縮して更なる精製のための放出／捕獲サイクルを可能にする。

本方法の別の態様は回収可能な支持体を特徴とする。本方法は標的核酸を含む可能性のある試料を、プローブ成分と会合した回収可能な支持体と接触させることを含む。回収可能な支持体は試料媒体中に実質上均質に分散できる。プローブ成分は例えばプローブ成分と回収可能な支持体との共有結合により、または親和力会合、水素結合あるいは非特異的会合により、回収可能な支持体と会合させることができる。

支持体は多くの形状をとることができ、例えば支持体含有試料媒体をふるいに通す際に回収しうる特定の形に縮小したニトロセルロース；磁場をかけた際に試料媒体中を移動しうるように、磁性粒子または類似物を含浸させたニトロセルロース；過可能であるか、または電磁性を示すビーズもしくは粒子；および水性媒体の表面に

分離するポリスチレンビーズが含まれる。

本発明の好適な態様は、試料媒体中に実質上均質に分散する能力により特徴づけられる磁性ビーズから成る回収可能な支持体を包含する。好ましくは、磁性ビーズはプローブ成分と磁性支持体粒子との共有結合または会合を容易にする一級アミン官能基を含む。好ましくは、磁性支持体ビーズは単磁区磁石（single domain magnet）であつて、残留磁気を示さない超常磁性である。第1プローブは結合条件下で抗リガンドと特異的に結合しうるプローブリガンド成分を含む。回収可能な支持体は試料媒体中で実質上均質に分散でき、結合条件下にリガンドと結合して標的一プローブ支持体複合体を形成しうる少なくとも1つの抗リガンド成分を含む。次に、回収可能な支持体と試料媒体とを分離して、試料媒体はさらに処理される。

本発明の態様は、無関係の物質を含む臨床試料媒体から標的分子を捕獲するのに適している。試料媒体をプローブまたは回収可能な支持体と接触させる順序は選択にかかる問題である。しかしながら、その選択は一方ではプローブと標的との間の結合速度論、他方ではプローブリガンドと支持体抗リガンドとの間の結合速度論により影響される。

ポリヌクレオチド標的分子およびホモポリマーリガンドおよび抗リガンドに適用した場合、ホモポリマーリガンドと抗リガンドの結合は一般にプローブと標的の結合よりも速い。プローブの標的への結合は、プローブリガンドが支持体抗リガンドと結合した後では立体的に妨害される。好適な態様は試料媒体と試薬とを接触させ、その混合物をハイブリダイゼーション条件に置くことを包含する。次に、回収可能な支持体は試薬と試料媒体の混合物中に分散させて、プローブー支持体複合体の形成に先立つて標的一プローブ複合体を形成させる。

本発明の別の態様は多重プローブ系を特徴とする。好ましくは、本方法は上記のような第1プローブおよび標的分子に結合でき且つ検出可能な標的成分をもつ少なくとも1種の第2プローブを包含する。第2プローブは標的一（第1および第2）プローブー支持体複合体を形成することができる。試料媒体からの回収可能な支持体の分離工程は、標的一（第1および第2）プローブー支持体複合体から無関係の物質を除くのみならず、標的分子と結合しないすべての第2プローブも分離する。標的と結合しない第2プローブはバツクグラウンドノイズの一因になり、偽の信号が標的の存在を示すことになる。

更なる処理は、標的一（第1および第2）プローブ複合体を回収可能な支持体から第2媒体中へ放出させ、次いでその複合体を新たな支持体へ再結合させることを包含する。回収可能な第1支持体は検定法を妨害しうる非特異的結合物質を保持するかもしれない。従つて、回収可能な支持体からの標的一プローブ複合体の放出および回収可能な支持体の除去の後に、プローブリガンドと結

合しうる抗リガンド成分をもつ第2支持体を標的一プローブ複合体と結合条件下で接触せしめて、標的一プローブ複合体のそれ以上の精製および濃縮のために標的一プローブの結合または捕獲サイクルをさらに続行することができる。

更なる処理はバツクグラウンド捕獲を包含する。本発明の別の態様は、第2プローブが第2リガンド成分をもつ方法を含む。この方法はさらに第2抗リガンド成分をもつバツクグラウンド支持体を含む。第2リガンド成分と第2抗リガンド成分は、第2プローブが標的分子に結合しないときだけ、結合条件下で安定して結合できる。この方法はさらに標的に結合しない第2プローブを含む可能性のある媒体をバツクグラウンド支持体と結合条件下で接触させることを含む。次に、バツクグラウンド支持体は媒体から分離して未結合第2プローブを除き、それによりバツクグラウンドノイズを池少させる。

“バツクグラウンド支持体”なる用語は通常の意味で使用され、フィルター、膜および回収可能な支持体を包含する。バツクグラウンド支持体への結合は解離可能である必要はない。

好適な回収可能支持体には、例えば媒体中に分散できしかも媒体から分離しうる粒子、顆粒、ビーズまたはフィラメントが含まれるが、これらに限定されない。分離方法としては、例えば過、遠心、沈澱、表面浮選、沈降、または電磁場の導入などがある。

本発明方法はポリヌクレオチド標的分子に応用できる。好ましくは、第1および第2プローブは、標的またはプローブが固定化されている場合とは対照的に、“溶解した状態”でポリヌクレオチド標的と速やかに結合する。

溶液中に実質上分散しうる回収可能支持体は、回収可能支持体とプローブとの相互作用（これは“溶解状態”的ハイブリダイゼーションを模倣するものである）を可能にする。溶解状態では、ハイブリダイゼーションは約3～15分で完結する。本方法の迅速なハイブリダイゼーションと簡易さにより自動化が可能である。本方法は臨床試料中に含まれる核酸配列を無関係の物質から分離することができ、それにより本方法を非同位元素標識技術に応用することが可能である。

標的分子がポリヌクレオチドである本方法の態様は、試料媒体と試薬とを結合条件下で接触させることを含む。その試薬には少なくとも1つの第1ポリヌクレオチドプローブおよび少なくとも1つの第2ポリヌクレオチドプローブが含まれる。第1プローブは標的分子と複合体を形成することができ、第1ホモポリマーリガンド成分を有する。第2プローブは第1プローブに結合した標的分子と複合体を形成することができる。その第2プローブは第1プローブの第1ホモポリマーリガンドとは異なる第2ホモポリマーリガンド成分をもつ標識成分を含む。次に試薬および試料媒体はバツクグラウンド支持体

と標的捕獲支持体とに接觸させる。バツクグラウンド支持体は、第2プローブが標的と結合しない場合、その第2プローブの第2ホモポリマーリガンド成分に結合しうる少なくとも1つの第2ホモポリマー抗リガンド成分を含む。標的捕獲支持体は第1プローブの第1ホモポリマーリガンド成分に結合しうる少なくとも1つの第1ホモポリマー成分を含む。バツクグラウンド支持体および標的捕獲支持体はバツクグラウンドノイズを除き、さらに標的捕獲支持体はその後の処理のために標的（第1および第2）プローブ複合体を濃縮し、且つ細胞破片からその複合体を分離する。その後の処理には標的分子の存在を示す標識成分の検出が含まれる。

今や、バツクグラウンド捕獲に関する本発明の態様をより詳細に説明すると、1つの態様にはプローブと標的が複合体を形成する方法が含まれる。次に、複合体を形成しなかつたプローブが結合条件下で支持体と接觸される。その支持体は未結合プローブと選択的に結合することができる。その後、支持体はプローブー標的複合体から分離される。

20 本発明のさらに別な態様は、その後の処理のために多数の標的を分離する方法を包含する。

1つの態様には多数の支持体上の標的分子に特異的なプローブの逐次付加および除去が含まれる。別の態様には試料を第1プローブ系列と接觸させて、その標的およびプローブを多数の支持体上へ捕獲する方法が含まれる。第1プローブ系列は支持体と会合しうるリガンドを含む。第1プローブ系列には、各標的分子に特異的な、支持体と結合しうる、多数の標的すべてのためのプローブが含まれる。支持体は互いから分離することができ、その分離は支持体と共に分離される個々のタイプの標的分子をもたらす。

本発明の別の態様は試薬組成物を包含する。試薬組成物には第1プローブおよび第2プローブが含まれる。第1プローブは標的分子と複合体を形成することができ、結合条件下で抗リガンドと特異的に結合しうるプローブリガンド成分を含む。第2プローブは標的分子と複合体を形成することができ、検出可能な標識成分を含む。この試薬組成物は抗リガンド成分をもつ回収可能な支持体と共に使用する場合、試料媒体中の標的を捕獲して検出するのに使用される。

40 本試薬組成物の別の態様は、第2プローブが標的分子に結合しない場合のみ、抗リガンドと安定して結合できる第2リガンド成分をもつ第2プローブを包含する。この試薬組成物は、未結合第2プローブを含む可能性のある試料を、第2抗リガンド成分をもつバツクグラウンド支持体と接觸させることにより、バツクグラウンドノイズを減少させる。

別の態様は試料媒体中に実質的に均質分散でき且つプローブ上のオリゴヌクレオチドリガンドと結合しうるオリゴヌクレオチド抗リガンドを有する支持体を含む。

支持体の好適な態様には、例えば分離可能な粒子、粗粒、フイラメントおよびビーズが含まれる。分離手段には例えば沈殿、沈降、浮選、過、遠心および電磁気などが含まれ、これらに限定されない。

好適な態様は、実質的に均質分散でき且つ過や浮選により媒体から分離できる直径が10～100ミクロンのポリスチレンビーズを包含する。他の好適な態様は強磁性ビーズを含む。BIO-MAGという商標名で市販されている強磁性ビーズは実質的に水性媒体中に均質分散でき、しかも電磁場により回収または固定化することができる。この強磁性ビーズはアミン反応性被膜で覆われた鉄心を含む。ビーズはほぼ球形であつて、1ミクロンの直径を有する。ポリスチレンビーズおよび強磁性ビーズは抗リガンド成分を含むように処理される。

本発明の別の態様は、生物学的結合対の一部である標的分子について検定を行うためのキットを包含する。標的が特定の塩基配列をもつポリヌクレオチドである場合、キットは第1ポリヌクレオチドプローブおよび第2ポリヌクレオチドプローブを含む試薬を包含する。第1および第2プローブは相互に排他的な標的部分と結合して、両プローブが標的に結合した複合体を形成することができる。第1プローブは結合条件下で第1支持体と可逆的に結合でき、第2プローブは検出可能な標識成分を含む。キットはさらに第1支持体を包含し、この支持体は試料媒体からの選択的分離を可能にする標的一プロープとの複合体を形成しうる。

本キットの別の態様は第2プローブおよびバツクグラウンド支持体を包含する。第2プローブは、標的と結合しない時、バツクグラウンド支持体と選択的に結合することができる。バツクグラウンド支持体は、非特異的に結合した第2プローブを除くために、試薬を含有する媒体から分離できる。

本発明の別の態様は、本方法に従つて検定を行うための装置を包含する。標的がポリヌクレオチドである場合、その装置は試薬および標的を実質的に均質な混合状態で収容するのに適した反応室を含む。試薬には第1および第2ポリヌクレオチドプローブが含まれる。各プローブは相互に排他的な標的部分と結合して、両プローブが標的に結合した複合体を形成することができる。第1プローブは結合条件下で第1支持体と可逆的に結合でき、そして第2プローブは検出可能な標識成分を含む。その装置はさらに、第1支持体を試薬および試料と接触させて、第1プローブおよび標的一プロープ複合体をその支持体に結合させるための手段を含む。その装置はさらに、支持体に結合した標的一プロープ複合体を形成すべく試料、試薬および支持体を結合状態にするための手段を含む。その装置はさらに、第1プローブを解離状態にするための手段を含む。最後に、その装置は試料および試薬から支持体を分離するための手段を含む。

“反応容器”なる用語は広義に使用され、例えば制限

するものでないがキュベット、試験管、毛細管などを含めたすべての収容手段を包含する。

試料、試薬および支持体を結合状態にしたり、あるいは試薬および支持体を解離状態にするための適当な手段は、例えばポリヌクレオチド鎖を選択的に変性またはアニーリングするために試料、試薬および支持体の温度を上げたり下げる温度制御ヲ包含する。

試料または試薬から支持体を分離するための適当な手段には、例えば磁性ビーズと共に使用される電磁石、固着支持体に固定された繊維、ポリスチレン粗粒と共に使用される遠心分離機などが含まれる。

本発明の別の態様は、標的と特異的に結合しなかつた標識成分含有第2プローブを除くために、試薬および標的をバツクグラウンド支持体と結合条件下で接触させるための手段を包含する。

発光標識成分と共に使用するに適した本装置の態様は適当な標識励起手段を含む。螢光標識成分と共に使用される装置は、適当な波長範囲を定めるフィルターを備えたレーザーまたは光線放射装置を含む。化学発光標識成分と共に使用される装置は、反応室にコファクターを注入するための注入装置を含む。

今や、本発明の好適な態様を図示した図面、特に第1図について見ると、標的ポリヌクレオチド鎖の検定のために必要な試薬組成物と共に検定手順が模式図により示されている。通常の検定法では多数の標的鎖が含まれ、多数のプローブ鎖を使用して検定が行われるであろう。しかしながら、簡略化して本発明を理解しやすくなるために、図面には限られた数のプローブ、支持体および標的のみを示す。第1図は回収可能な支持体を使用する方法に関する。

第1図に示す検定の工程1は、細胞を含む臨床試料により開始される。細胞は病原菌、遺伝病または望ましい遺伝子特性を示す特に興味ある塩基配列を有する標的核酸（DNAまたはRNA）を保有する可能性がある。その臨床試料は大便、尿、唾液、膿、血清、血漿、眼レンズ液、脊髄液、リンパ液、生殖器洗液などのような排泄物または生理学的液体から得られる。当分野で習熟した者は、当分野で知られた方法により生検（バイオプシー）試料を单一細胞懸濁液または小塊にすることができる。例えば、固体組織の生検試料はその生検試料を0.5M塩化ナトリウム、10mM塩化マグネシウム、0.14Mリン酸緩衝液（pH 6.8）および25mg/mlシクロヘキサミドの混合物中で攪拌することにより、効果的に单一細胞懸濁液または細胞小塊にすることができる。また、この工程において特定の細胞型を示差遠心、密度勾配遠心または他の方法のような当分野で知られた方法により単離することもできる。

その後、細胞はそれらのDNAおよび/またはRNAを放出させるべく処理される。化学的細胞溶解が当分野でよく知られている。化学的細胞溶解は希薄アルカリ水溶液

(例えば0.1~1.0M水酸化ナトリウム)を用いて行われる。そのアルカリはまたDNAやRNAを変性するのに役立つ。その他の変性および細胞溶解剤には高温、有機試薬(例えはアルコール、アミド、アミン、尿素、フエノールおよびスルホキシド)、またはある種の無機イオン(例えはトリフルオロ酢酸ナトリウム、トリクロロ酢酸ナトリウム、過塩素酸ナトリウム、イソチオシアニン酸グアニジニウム、ヨウ化ナトリウム、ヨウ化カリウム、イソチオシアニン酸ナトリウムおよびイソチオシアニン酸カリウムのようなカオトロピズム塩)が含まれる。

臨床試料はまた種々の制限エンドヌクレアーゼの作用によりDNAまたはRNAを分割して、比較的取り扱いやすいセグメントにすることができる。試料処理工程の完了時に、臨床試料は試料核酸、細胞破片および不純物を含有する。過去においては、試料核酸は核酸をフィルターや膜に非特異的に結合させ、その後フィルターや膜から細胞破片と不純物を洗い落とすことにより、細胞破片と不純物から分離された。しかしながら、実際には、若干の細胞破片および若干の不純物ならびに標的以外の核酸がフィルターや膜に非特異的に結合され、洗浄によつても除去されずに残存する。

本発明の態様は、工程1に例示されるごとく、標的核酸を保有する可能性のある試料を、プローブ成分と会合した回収可能な支持体と接触させることを包含する。回収可能な支持体は試料媒体中に実質的に均質分散しうる。プローブ成分は、例えはプローブ成分と回収可能な支持体との共有結合、親和力会合、水素結合または非特異的会合により回収可能な支持体と会合することができる。

支持体は多くの形態をとることができ、例え粒状形体に縮小され且つ支持体含有試料媒体をふるいに通すとき回収しうるニトロセルロース；磁場をかけた際にニトロセルロースが試料媒体中を移動できるように、磁性粒子で含浸されたニトロセルロース；過できるか又は電磁性を示すビーズまたは粒子；および水性媒体の表面に分配されるポリスチレンビーズが含まれる。

本発明の好適な態様は、試料媒体中に実質的に均質分散しうる能力により特徴づけられる磁性ビーズから成る回収可能な支持体を包含する。好ましくは、磁性ビーズはプローブと磁性支持体粒子との共有結合または会合を容易にする第1アミン官能基を含む。好ましくは、その磁性支持体ビーズは単磁区磁石であり、残留磁気を示さない超常磁性である。

粒子またはビーズは磁鉄鉱粒子から成りうるが、それは反応性表面を有し且つ磁場に作用する能力を示す限り、不純金属、合金または複合材料の形の他の磁性金属または金属酸化物でありうる。個々に又は鉄との組合せで使用される他の材料には、コバルト、ニッケルおよびケイ素が含まれるが、これらに限定されない。磁鉄鉱または金属酸化物粒子の製法はバンデンベルグ(Vandenbe-

rghe)ら、“超微細コバルトフェライトの製法および磁性”、J.of Magnetism and Magnetic Materials, 15~18:1117~18 (1980) ; マチエビツク(E.Matijevic)、“单分散金属(含水)酸化物——コロイド科学の興味ある分野”、Acc.Chem.Res., 14:22~29 (1981)に記載されており、その内容は参照によりここに引用される。

本発明で使用するのに適した磁性ビーズには、アドバンスト・マグネティクス社(Advanced Magnetics, Inc.)からBIO-MAGという商標名で市販されている第1アミン官能基含有磁性ビーズが含まれる。好適な磁性粒子は非多孔質であるにもかかわらず、プローブ成分と会合することができる。プローブ成分の会合に関与しない反応性部位は遮断して他の試薬、不純物および細胞物質の非特異的結合を防ぐことが好ましい。磁性粒子は好ましくは実質的にコロイド状の懸濁物として存在する。試薬および基質および粒子表面に会合したプローブ成分は、その粒子を取り囲む溶液中に直接延在している。プローブ成分は固体支持体に担持された反応と関連した速度ではなくむしろ溶液中の反応に特徴的な速度および收率でもつて、溶液中の溶存試薬および基質と反応する。さらに、粒子サイズを減ずるにつれて、粒子の表面積対容積の比が増加し、それにより磁性粒子の単位重量あたりより多くの官能基およびプローブを結合させうる。

反応性アミン官能基を有するビーズは、ポリスクリオチドをそのビーズに共有結合させるべくポリスクリオチドと反応させることができる。ビーズはリン酸ナトリウム緩衝液中で10%グルタルアルデヒドと反応させ、統いて実験プロトコールにおいてより詳しく説明する方法によりリン酸緩衝液中でリン酸化ポリスクリオチドのエチレンジアミン付加物と反応させる。

さて工程2に戻ると、プローブ成分と会合した回収可能支持体は臨床試料と接触させ、工程3に進んで結合条件に置く。対象となる標的に特異的なプローブ成分は臨床試料中に存在する標的鎖に結合される。試料および試薬媒体中に分散した回収可能支持体は、あたかもそれらが溶液中で遊離状態にあるように、プローブ成分と標的をハイブリダイゼーションすることができる。

プローブと標的のハイブリダイゼーションは約15分で完結する。これとは対照的に、媒体中に分散する能力をもたない支持体上にプローブまたは標的が固定化されたハイブリダイゼーションでは3~48時間もの長時間を要する。

無関係のDNA、RNA、細胞破片および不純物は支持体と特異的に結合しない。しかしながら、実際的方法として、少量の無関係のDNA、RNA、細胞破片および不純物は回収可能支持体を含む反応容器内に置かれたすべての物体に非特異的に結合することができ、現に結合する。本発明の態様は、標的ポリスクリオチドから無関係のDNA、RNA、細胞破片および不純物を取り除くべく臨床試料の更なる精製を容易にするものである。

第1図の工程4は臨床試料からの支持体の分離および第2媒体中への支持体の懸濁を示す。従つて、第2媒体は標的ポリヌクレオチド鎖と結合したプローブをもつ回収可能支持体を含む。また、その支持体と非特異的に結合した無関係のDNA、RNA、細胞破片および不純物も随伴されるが、臨床試料中に初めに存在していた濃度よりもかなり低い濃度である。当分野で習熟した者は、第2媒体中に懸濁する前に支持体を洗浄することにより若干の望ましくない物質を減らすことができることを認めるであろう。

第2媒体中に懸濁された回収可能支持体（会合プローブおよび標的をもつ）は工程5に示すような変性に付され、それにより回収可能支持体のプローブ成分から標的を解離させる。変性操作は回収可能支持体から非特異的に結合した無関係のDNA、RNA、細胞破片または不純物を放出させたり、放出させなかつたりする。しかしながら、本方法の工程5は第1臨床試料媒体から初めに運ばれた非特異的に結合した細胞破片、不純物、無関係のDNAおよびRNAの多くを支持体と共に保有する第2媒体から、回収可能支持体を分離させる。

工程6に示すように、新しい支持体が結合条件下で第2媒体中に導入され、その回収可能支持体と会合したプローブ成分上に標的ポリヌクレオチド鎖が再び捕獲される。当分野で習熟した者は、新しい支持体が非特異的に結合したDNA、RNA、細胞破片および不純物をさらに精製・除去する工程に循環させた後のもとの回収可能支持体を実際に含みうることを認めるであろう。従つて、第2媒体中に存在する不純物のみが、以前に支持体へ非特異的に結合され、その後第1支持体から放出されて第2媒体中に溶解または懸濁されたDNA、RNA、細胞破片および不純物を包含する。

しかしながら、この種の不純物は回収可能な第2支持体を第2媒体から分離し、そして再び回収可能な支持体を別の媒体に導入し、変性し、古い支持体を分離することから成るサイクルを繰り返すことにより、標的ポリヌクレオチドからさらに除去することができる。当分野で習熟した者は、溶液が除去されるかまたは収能容器へ添加されるとき、本発明で説明した磁性ビーズは適所に保持しやすく、また溶液から取り出しやすいことを認めるであろう。

“溶解状態の反応速度論（insolution kinetics）”をまねた反応に関与する磁性ビーズの能力は、変性および標的への結合のサイクルの完了を3～15分で達成せらる。

十分な精製および濃縮後に、標的是工程8に示すような当分野で知られた発光または放射性検定法により検出することができる。標的を含む媒体の精製は、細胞破片および不純物の不在下での非同位標識成分の検出を可能にする。

さて今や第2図に転ずると、第2図は多重プローブ法

を特徴としており、そこには可溶化剤および試薬の導入により先の図面の臨床試料と同様に処理されるポリヌクレオチド標的を含む臨床試料から始まる本検定法の別の態様が示されている。第2図に示した検定法の試薬には第1ポリヌクレオチドプローブ鎖（P<sub>1</sub>）および第2ポリヌクレオチドプローブ鎖（P<sub>2</sub>）が含まれ、両プローブ（P<sub>1</sub>およびP<sub>2</sub>）は標的と結合して標的との複合体を形成することができる。第1プローブ（P<sub>1</sub>）は結合条件下に回収可能支持体（S<sub>1</sub>）と会合しうる。第2プローブは検出可能な少なくとも1つの標識成分を有している。図面において、標識成分は星印により示される。変性条件下での可溶化剤および試薬の導入後、臨床試料を含む溶液は標的ポリヌクレオチド、第1および第2プローブの形の試薬、細胞破片、可溶化剤、不純物および無関係のDNAおよびRNAを含有するであろう。

工程2に示すように、第1および第2プローブ（P<sub>1</sub>およびP<sub>2</sub>）は標的の相互に排他的な部分と結合条件下で結合する。溶解状態での両プローブ（P<sub>1</sub>およびP<sub>2</sub>）と標的とのハイブリダイゼーションは迅速であり、しかも固体支持体との会合により妨害されない。第1および第2プローブ鎖（P<sub>1</sub>およびP<sub>2</sub>）への標的の結合を確実にするために、過剰のプローブが使用される。しかしながら、たとえ過剰のプローブ（P<sub>1</sub>およびP<sub>2</sub>）が使用されないとしても、若干のプローブは標的を発見できずに試料媒体中にハイブリダイズされないまま残存するであろう。ハイブリダイズされなかつた標識成分含有第2プローブ（P<sub>2</sub>）は、もしも検出中に存在するならば、バツクグラウンドノイズの原因になるであろう。

第1プローブ（P<sub>1</sub>）は支持体上の抗リガンド成分と結合しうるリガンドにより支持体（S<sub>1</sub>）と結合できる。リガンド（L<sub>1</sub>）には例えばホモポリマーから成る尾部が含まれる。支持体（S<sub>1</sub>）はリガンド（L<sub>1</sub>）を受容してそれと結合しうる抗リガンド（A<sub>1</sub>）を包含する。抗リガンド（A<sub>1</sub>）には例えばプローブ（P<sub>1</sub>）のリガンド（L<sub>1</sub>）に相補的なホモポリマーが含まれる。

さて工程3に転ずると、結合条件下で支持体（S<sub>1</sub>）の抗リガンド成分（A<sub>1</sub>）は第1プローブ（P<sub>1</sub>）のリガンド成分（L<sub>1</sub>）と会合または結合し、そしてその第1プローブはそれ自体が標的と結合し且つ第2プローブ（P<sub>2</sub>）に連結している。支持体はいろいろな形をとることができる。ビーズまたは粒状支持体は溶液中に分散され、溶解状態に近い反応速度論を示す反応により標的プローブとの結合に加わることができる。さらに、回収可能なビーズおよび粒状支持体は、より一般的なフィルターや膜にもともと存在する目詰りの問題なしに、不溶性細胞破片からプローブ標的複合体を分離させうる。

しかしながら、一般的な膜、フィルターまたはセルロース支持体も目詰りが問題とならないいくつかの用途において使用できる。溶液中でのプローブと標的との迅速なハイブリダイゼーションゆえに、固体の非ビーズ状ま

たは非粒状膜もしくはフィルター支持体を反応容器中に組み入れることができる。試薬および試料の溶液は支持体を通過して、標的が捕獲される。支持体 ( $S_1$ ) は回収可能な支持体として第2図に示される。

溶液中には標的一プローブ支持体複合体と共に未結合の第1および第2プローブ成分、未結合標的、可溶化剤、不純物および細胞破片が存在する。標識成分をもつ未結合第2プローブ ( $P_2$ ) はノイズの原因となり、標的の存在によく似た信号を発する。少量の無関係の細胞破片、可溶化剤、不純物およびプローブも回収可能支持体と非特異的に結合しうる。

工程4において、支持体 ( $S_1$ ) は臨床試料媒体から分離される。回収可能支持体を使用する場合、分離は反応容器内に回収可能支持体を固定化することにより、または試料媒体から回収可能支持体を直接取り出すことにより達成しうる。当分野で習熟した者は、固定化支持体を洗浄して望ましくない物質を減らすことができることを認めるであろう。

さて工程5に転ずると、標的一プローブ支持体複合体は実質的に無関係のRNA、DNA、可溶化剤、不純物および細胞物質を含まず、従つて標的分子の存在を示す標識成分の存在について監視することができる。しかしながら、少量の無関係のDNA、RNA、可溶化剤、不純物および細胞物質がまだ支持体 ( $S_1$ ) と非特異的に結合しているかもしれない。さらに、標的と会合していないという意味で未結合の第2プローブ ( $P_2$ ) もまた支持体 ( $S_1$ ) と非特異的に結合でき、非同位体標識成分からの信号に影響を及ぼす。標識成分をもつ未結合第2プローブ ( $P_2$ ) の存在はバツクグラウンドノイズの主な原因となり、それにより検定法の正確度が減ぜられる。

従つて、別の工程5として、第1支持体 ( $S_1$ ) を第2媒体中に懸濁し、その第2媒体中で変性することにより支持体 ( $S_1$ ) を標的一プローブ複合体から分離することができる。

変性後、工程6において、第1支持体 ( $S_1$ ) は第2媒体から分離され、第2支持体 ( $S_2$ ) と置き換えられる。第2支持体 ( $S_2$ ) は第1プローブのリガンド成分 ( $L_1$ ) と結合しうる抗リガンド成分 ( $A_1$ ) を含む。

工程7に移ると、標的一プローブ複合体は結合条件下で第2支持体 ( $S_2$ ) と再会合する。第1支持体 ( $S_1$ ) の除去は、その後第1支持体 ( $S_1$ ) と非特異的に結合した無関係の物質、破片およびプローブを検定媒体から除去する。

工程8に示すように、標的一プローブ複合体を含む媒体は標識の存在について検定される。しかしながら、検定媒体をさらに精製することにより、第1支持体 ( $S_1$ ) に非特異的に結合され、その後第1支持体 ( $S_1$ ) から第2媒体中に溶解または解離された試料媒体由来の無関係の物質およびバツクグラウンドの存在をさらに減ずることができる。

従つて、回収可能な第2支持体 ( $S_2$ ) を第3媒体と接触させ、その第3媒体を支持体から標的一プローブ複合体を放出させる条件に至らせ、その後支持体を除去して更なるサイクルを完結させることができる。サイクルの回数は試料のタイプ、標識成分の種類、および検出装置の感度に応じて選択されるだろう。異なるタイプの支持体を異なる時点での使用してもよい。従つて、回収可能な支持体を使用することにより初めに試料媒体または溶液から標的一プローブ複合体を集めまたは濃縮し、こうして膜やフィルターに特有の目詰りの問題を避けることができる。第2または第3支持体は第1プローブ ( $P_1$ ) のリガンド成分 ( $L_1$ ) と結合する抗リガンド成分 ( $A_1$ ) をもつ膜またはフィルターを含むのが好ましい。膜またはフィルター支持体は標的一プローブ複合体を流動回収させる処理工程を単純化することができる。

本発明の別の態様はバツクグラウンドノイズを減らすのに特に適している。今や第3図を見ると、そこには第2図に示した検定法の変法が示されている。第3図において、標的ポリヌクレオチドは第2図に記載のプローブ成分と類似した第1および第2プローブ成分 ( $P_1$  および  $P_2$ ) と複合体を形成している。しかしながら、第2プローブは第2リガンド ( $L_2$ ) を含む。その第2リガンド ( $L_2$ ) には例えばホウ酸抗リガンドと複合体を形成する单一末端リボヌクレオチド、相補的コポリマーと結合するコポリマー、アビシン抗リガンドに結合するビオチンリガンド、または図示したようなホモポリマーリガンド ( $L_2$ ) および相補的ホモポリマー抗リガンド ( $A_2$ ) が含まれる。

今や工程1に転ずると、第2プローブ ( $P_2$ ) が標的と結合していない時だけその第2プローブ ( $P_2$ ) と選択的に結合しうるバツクグラウンド支持体が、標的一プローブ複合体を含む媒体と接触させられる。その媒体は遊離の、会合していない第1および第2プローブ ( $P_1$  および  $P_2$ ) をさらに含む。バツクグラウンドノイズの原因となる標識された第2プローブ ( $P_2$ ) は、バツクグラウンド支持体 ( $B_1$ ) と会合した大過剰モルの抗リガンド成分 ( $A_2$ ) により、そのバツクグラウンド支持体 ( $B_1$ ) と特異的に結合する。未結合の標識プローブ ( $P_2$ ) とバツクグラウンド支持体 ( $B_1$ ) の結合後、工程2に示すようにバツクグラウンド支持体 ( $B_1$ ) を媒体から除去する。標的一プローブ複合体を含有する媒体は、バツクグラウンドノイズの減少後、第2プローブ ( $P_2$ ) に保有された標識の存在について検定される。あるいは、標的一プローブ複合体を含む媒体は更なる処理に付される。

更なる処理は第3図に示した工程1～3、または第2図に示した諸工程を繰り返すことによるバツクグラウンドの更なる減少を包含する。例えば、バツクグラウンド減少工程は、第1および第2プローブのリガンドおよび抗リガンド成分が干渉せず、且つ標的が表1および第2プローブと複合体を形成するいずれかの時点で、第2図

に示すような臨床試料の処理に組み入れられる。

本方法の態様は第4図に模式図で示した装置を用いて実施される。この装置は次のような主な要素：すなわち少なくとも1つの収納容器、プローブと標的分子および回収可能な支持体との会合を制御する手段、試料溶液から回収可能支持体を分離する手段、および回収可能支持体から標的分子を放出させる手段を包含する。これらの主な要素は多種多様な形をとることができ、以下でさらに詳しく述べる。

この装置はポリヌクレオチドを含む標的分子に関して第2図および第3図で示した方法を適用して、例示目的のために以下で説明されるであろう。こうして、ステーション1では、臨床試料が細胞物質を溶解して核酸を放出させるために、可溶化剤（例えばカオトロビズム塩、酵素および界面活性剤）と一緒に収納容器中に入れられる。その収容容器は細胞の破壊を容易にするための攪拌部材を備えている。その収納容器は試料を入れるのに適したどのような型の容器、管またはキュベット（浅い水ばち）であつてもよい。

自動分析用に設計された器械では、第4図に示した装置は多数の収納容器を受容する手段を含むであろう。例示目的のために、試料を含む収納容器は逐次分析される。こうして、収納容器は第1ステーションへ、統いて検定法の種々の工程が行われる後続のステーションへ搬送される。

各ステーションは搬送手段により連結されている。搬送手段には回転可能なターンテーブル、コンベアーベルトなどが含まれる。臨床病院に設定する場合、搬送手段は手動移動を含みうる。従つて、病院スタッフが患者から組織試料を採取し、その試料を収納容器に入れる。組織試料の破壊および可溶化剤と試薬類の初期混合を含めた試料処理はベッドのそばで開始され、そしてその後の処理のために収納容器を後続のステーションへ移動せながら継続されるであろう。ステーションへの言及は例示目的のためである。当分野で習熟した者は、いくつかのステーションまたは工程を組み合わせたり逆にしたりしうることを認めるであろう。

さて第1ステーションに戻ると、試料と可溶化剤を収納容器に入れ、その中の攪拌部材により試料と可溶化剤を完全に混合して細胞物質から核酸を放出させる。搬送手段によりその収納容器をステーション2へ運び、そこで収納容器は試薬を受け取る。

試薬は第1ポリヌクレオチドプローブおよび第2ポリヌクレオチドプローブを含む。第1および第2プローブは標的ポリヌクレオチドと複合体を形成することができ、その際両プローブは標的の相互に排他的な部分と結合する。第1プローブはまた結合条件下で回収可能な支持体と結合しうる。第2ポリヌクレオチドプローブは検出可能な標識成分を含む。試薬と核酸試料は加熱部材により変性され、その後ステーション3に運ばれる。

ステーション3において、収納容器は円により示される第1支持体を受け取る。第1支持体は適当な手段（攪拌部材を含む）により試料媒体中に均質分散される。適当な支持体の例にはポリスチレンビーズ、磁性ビーズおよび他の粒状またはフィラメント状物質が含まれるが、これらに限定されない。先に例示したように、第1支持体はデオキシチミジン(dT)のポリヌクレオチド抗リガンドを有する磁性ビーズでありうる。第1プローブは結合またはハイブリダイゼーション条件下で第1支持体に結合しうるデオキシアデノシン(dA)の尾部を含む。

ステーション4へ移動すると、そこでは冷却部材で冷却されることにより試料媒体にハイブリダイゼーション条件が課せられる。しかしながら、当分野で習熟した者は塩濃度を変える手段が熱制御手段に容易に取つて代わり得ることを認めるであろう。こうして、標的ポリヌクレオチドは第1および第2プローブと複合体を形成し、さらに第1プローブのホモポリマー-デオキシアデノシン(dA)尾部が回収可能支持体のデオキシチミジン(dT)ホモポリマーとハイブリダイズする。

ステーション4からステーション5へ収納容器は移動し、そこで回収可能な支持体が磁性部材を活性化することにより収納容器の壁に固定化される。ポリスチレンビーズを磁性ビーズの代わりに使用する場合、ポリスチレンビーズは過または密度差により固定化されるであろう。試料媒体は大部分の無関係のDNA、RNA、可溶化剤、細胞物質および不純物を保有し、廃棄される。固定化された回収可能支持体は無関係のDNA、RNA、可溶化剤、細胞物質および不純物をさらに除くために洗浄される。

さらに、回収可能支持体は反応容器の壁に固定化されるよう例示されているが、磁性部材により回収可能支持体を反応容器から取り出して、反応容器の壁に非特異的に結合しやすい無関係のDNA、RNA、可溶化剤および細胞物質を含む第1の反応容器を処分することもできる。

回収可能支持体は同一の収納容器か又は新たな収納容器中の第2媒体に添加される。第2媒体中に回収可能支持体を含む収納容器はステーション6に送られる。

ステーション6において、第2媒体は加熱部材を含む適当な手段で変性条件に至らせる。この変性工程は回収可能支持体の(dT)ホモポリマーから標的-第1および第2プローブ複合体を遊離させる。無関係のDNA、RNA、不純物および細胞物質を含む可能性のある第1支持体は第2媒体から除去する。その後バツクグラウンド支持体を第2媒体と接触せしめ、ステーション7へ送る。

ステーション7で第2媒体は冷却部材によりハイブリダイゼーション温度にする。バツクグラウンド支持体は第2プローブに担持されたリガンドと特異的に結合しうる第2抗リガンドを含む。例えば、制限するものではないが、第2プローブの末端ヌクレオチドは第2支持体に担持されたホウ酸成分と特異的に結合するリボ誘導体として合成される。プローブ-標的複合体の一部として標

的に結合した第2プローブは、立体障害のために第3支持体に担持されたホウ酸と結合しないだろう。しかしながら、未結合の第2プローブはホウ酸支持体と特異的に結合するだろう。また、第2プローブは第2支持体上のデオキシグアニン(dG) ホモポリマーリンカーと結合するデオキシシトシン(dC) のようなホモポリマーを含みうる。ホモポリマーの長さは、標的ー第1および第2プローブと第2支持体との複合体が不安定であるが、第2プローブ単独と第2支持体との複合体が反応パラメータ内で安定であるように考案される。実際、未結合第2プローブに対するバツクグラウンド支持体のバツクグラウンド捕獲結合は不可逆的である。

次に、第2媒体およびバツクグラウンド支持体を含む収納容器はステーション8に搬送され、ここで標的一ープローブ複合体に結合していない第2プローブ鎖を有するバツクグラウンド支持体が第2媒体から分離される。バツクグラウンド支持体の分離により、媒体から非特異的なバツクグラウンドノイズが除かれる。

先に述べたように、バツクグラウンド捕獲はビーズ上で実施される。しかしながら、当分野で習熟した者は、臨床試料からの標的ー第1および第2プローブ複合体の初期精製により全部または大部分の固体碎片が除かれ、第2媒体が通過するフィルターまたは膜支持上にバツクグラウンドが捕獲されることを認めるであろう。

ステーション8から、バツクグラウンドの低減した標的ープローブ複合体を含む精製媒体はステーション9へ送られる。ステーション9で、加熱部材によりハイブリダイゼーション温度にした第2媒体を第3支持体(膜またはフィルターとして図示される)と接触させる。第3支持体は第1プローブの第1リガンド成分と結合する第1抗リガンド成分を含有する。従つて、第1プローブの第1リガンド成分がデオキシアデノシン(dA)のホモポリマーである場合、第3支持体はデオキシチミジン(dT)のホモポリマーを含む。先に述べたように、第3支持体は第2媒体が通過し得るフィルターまたは膜であるが、ビーズや粒子も使用できる。第3支持体は標的ー第1および第2プローブ複合体をさらに濃縮するのに役立ち、そして第3支持体と特異的に結合しないバツクグラウンドおよび妨害物質をさらに低減せしめる。ステーション10へ移ると、第3支持体は標的ー第1および第2プローブ複合体を濃縮し、それにより第2プローブに担持された標識成分の検出が可能となる。

本発明は以下の一般方法および好適な態様の特徴を例示する以下の実施例においてさらに詳述される。

## I. 方法

### A. 物質

全ての試薬は分析用またはそれ以上のものであつた。BIO-MAGという商標名で市販されている官能性アミノ基含有磁性ビーズはアドバンスト・マグネチツクス社(M.A.ケンプリツジ)から入手した。

本実施例において、全ての標識ヌクレオチドはニューアイングランド・ヌクレアーカーから入手した。酵素ターミナルデオキシヌクレオチジルトランスクエラーゼ(TDT)はライフ・サイエンス社(フロリダ州セントピータースバーグ)から入手した。オリゴヌクレオチドpdT<sub>10</sub>はフアーマシアPLバイオケミカルズから入手した。

### B. プローブの合成

一般的なプロトコールおよび方法を以下に説明する。第6図を参照されたい。2つのプローブはスパイサー(Spicer.E.K.)およびノーブル(J.A.Noble)、*J.of Biological Chem.* 257, 55716~55751(1982)に記載される構築マップ(第6図)に従つて、大腸菌(*Escherichia coli*)のエンテロトキシン遺伝子`elt A1`のセンス鎖(sense strand)に構築された。

1組のプローブはその遺伝子配列の483位から始まつて30ヌクレオチド長だけ延びるように合成され、以後A483プローブと名づけた。第2プローブはその遺伝子配列の532位から始まつて30ヌクレオチド長だけ延びるように合成され、以後これをA532プローブと名づけた。第3プローブはその遺伝子配列の726位から始まつて39ヌクレオチド長だけ延びるように合成され、以後これをA726プローブと名づけた。特定の塩基配列(5' → 3')を以下の表Iに示す:

表 1  
塩基配列  
プローブ

A 4 8 3	AGA CCG GTA TTA CAG AAA TCT GAA TAT AGC
A 5 3 2	AGA TTA GCA GGT TTC CCA CCG GAT CAC CAA
A 7 2 6	GTC AGA GGT TGA CAT ATA TAA CAG AAT TCG GGG GGG GGG

上記プローブは当分野で利用し得る方法により合成された。ナンバリング方式はインテリジエネティクス・シーケンス・バンク ECO ELT A1から入手し得る768ヌクレオチド配列から適応させた。

プローブA726の3'末端の10個のG残基のうち、5'末端へ向かう3個のグアニン塩基はトキシン遺伝子の3個の相補的なシトシン塩基と結合することができる。3個の連続したシトシンはDNA中に普通に見られる。10個のグアニン塩基はオリゴdC-セルロースのような支持体に担持されたポリC抗リガンドと結合し得るリガンドを形成する。しかしながら、7個のグアニン塩基は37°Cで、特にプローブが標的と結合している場合は、立体障害および標的-プローブ複合体の大きさのために、支持体と安定な会合を形成しないだろう。プローブA726はタ

ーミナルトランスクレオチドを用いてその3'末端へ約3個の<sup>32</sup>P-dCおよび<sup>32</sup>P-dG残基をランダム付加することにより修飾した。

当分野で習熟した者は、他のプローブを別の標的分子に対して容易に合成し得ることを認めるであろう。

#### C. 調製

実施例1、2および3の標的はエンテロトキシン遺伝子elt A1である。エンテロトキシン遺伝子elt A1はスタンフォード大学から入手したプラスミドEWD-299の一部として保有される。

実施例1において、エンテロトキシン産生菌をルリア培地中で対数期まで増殖させた。その細菌を溶解し、プラスミドEWD-299を単離した。プラスミドEWD-299は制限酵素Xba IおよびHind IIIで消化した。475塩基長のフラグメントを標的として使用し、1%アガロースゲルから電気溶出により精製した。捕獲工程の効率を追跡するために、フラグメントは酵素ボリヌクレオチドキナーゼを用いて製造者の指示に従つて<sup>32</sup>P-ATPで5'末端標識した。

実施例2および3では、エンテロトキシン産生菌および野生型エンテロトキシン非産生大腸菌JM83を別々に対数期まで増殖させた。野生型大腸菌は対照として役立つ。エンテロトキシン産生菌と野生菌の抽出物は、カオトロピズム溶液中で細胞を実質上可溶化することにより別々に調製した。こうして、ルリア培地中の細菌培養物を5M濃度の固体グアニジニウムチオシアネート(GuSC N)、0.3M濃度のトリス-HCl、および0.1濃度のEDTA(pA7)に添加した。その後カオトロピズム-細菌溶液は10°Cで5分間加熱し、冷却した。得られたエンテロトキシン産生菌抽出物は野生型エンテロトキシン非産生菌抽出物で段階的に希釈した。細胞当たりのtoxプラスミドの濃度および抽出物中の細胞数は慣用技法で測定した。GuSCN中で可溶化したもとの抽出物は約10<sup>9</sup>個/mlのエンテロトキシン産生大腸菌および細胞当たり100個のプラスミドを含んでいた。

#### D. ビーズの合成

回収可能な支持体は磁性ビーズから製造した。他の回収可能支持体には粒子、纖維、ポリスチレンビーズまたは媒体から物理的に分離し得る他の物品が含まれる。磁性ビーズは10塩基長のデオキシチミジンの付加物をもつように合成され、その結果ビーズはデオキシアデノシンを尾部に付加したプローブと容易に可逆的な方法で会合することができる。

従つて、BIOMAG (M4100) ビーズのようなアミン官能基をもつビーズ100mlは4個の275ml Tフラスコ中で20mMリン酸ナトリウム(pH6.7)により4回洗浄した。その後ビーズは20mMリン酸ナトリウム中の1%グルタルアルデヒドで洗浄した。次いで、ビーズは20mMリン酸ナトリウム(pH6.7)中の10%グルタルアルデヒド100mlと室温で3時間反応させた。その後ビーズは20mMリン酸ナ

リウム (pH6.7) で十分に洗浄し、次に20mMリン酸塩 (pH7.6) で一回洗浄した。

別個に、精製したpdT<sub>10</sub> のエチレンジアミン (EDA) 付加物 (EDA-dT<sub>10</sub>) をチュー (Chu,B.C.F.) 、ウォール (G.M.Wahl) 、およびオーゲル (L.E.Orgeil) 、Nucleic Acid Res. 11, 6513~6529 (1983) (参照によりここに引用される) に従つて製造した。EDA-dT<sub>10</sub> の濃度は20mM リン酸塩 (pH7.6) 中10D/m1に調整した。

EDA-dT<sub>10</sub> は磁性ビーズの遊離アルデヒド基と反応させるために磁性ビーズと混合した。EDA-dT<sub>10</sub> とビーズの混合物は複数の50m1ポリプロピレン製チューブに分割して入れた。反応混合物とビーズを含むチューブは回転器の中に置き、室温で一晩攪拌した。

次に、ビーズは大型の275m1 Tフラスコ中で滅菌20mM リン酸塩 (pH6.7) の洗液により5回洗浄して非共有結合したEDA-dT<sub>10</sub> を除き、その洗液で希釈して200m1とした。

貯蔵のために、ビーズは20mMリン酸塩緩衝液 (0.1% アジ化ナトリウムおよび0.1%SDSを含む) 中で数ヶ月間保存できる。ビーズ調製物は光を遮断して4°Cで保存される。

その後、ビーズは非特異的結合部位を遮断するためには、0.75Mリン酸ナトリウム (pH6.8) 、0.5%ラウロイルサルコシンナトリウム、10μg/m1大腸菌DNA、0.5mg/m1ウシ血清アルブミン (BSA) (ヌクレアーゼ不含) および5mMエチレンジアミン四酢酸 (EDTA) から成る緩衝液 (以後“プレハイブリダイゼーション緩衝液”と呼ぶ) 中でプレハイブリダイゼーションを行つた。標的捕獲法でプローブとビーズを使用する前に、ビーズのプレハイブリダイゼーションを2回実施した。そのプレハイブリダイゼーション法はビーズを10倍容量のプレハイブリダイゼーション緩衝液に入れることを包含していた。

第1のプレハイブリダイゼーション法は攪拌しながら60°Cで行つた。第2のプレハイブリダイゼーション法は渦巻きを起こさせながら室温で実施した。この溶液には0.1%のイソアミルアルコールを消泡剤として添加した。

dT<sub>10</sub>-付加ビーズの結合能は次の方法により測定した。別々の容器中で、dT<sub>50</sub> およびdA<sub>50</sub> はそれぞれ<sup>32</sup>P-dTおよび<sup>32</sup>P-dAを用いて約10<sup>6</sup>dpm/μgの比活性 (Sa) になるまで5'末端標識した。次に、既知量の反応したdT<sub>50</sub> のSaをトリクロロ酢酸沈降により正確に測定した。

次いで、100,000~200,000dpm/mgの実質的に同一のSaをもつ<sup>32</sup>P-dA<sub>50</sub> 5μgおよび<sup>32</sup>P-dT<sub>50</sub> 5μgはプレハイブリダイゼーション緩衝液を含むチューブに別々に加えて1m1の容量とした。

プレハイブリダイズしたビーズはその既知試料容量を4個のチューブに入れた。4個のチューブのうち2個はそれぞれ0.5m1の<sup>32</sup>P-dA<sub>50</sub> 混合物を添加し、残りの2個のチューブはそれぞれ0.5m1の<sup>32</sup>P-dT<sub>50</sub> 混合物を添加し

た。4つの溶液すべてはハイブリダイゼーション条件に5分間おいた。その後ビーズを固定化して洗浄し、次に溶液の比活性を測定した。マイクログラムで測定した一定量のビーズ調製物の総結合能Cは次式で表される：

$$C = V (A - T) / X$$

上記式中Xは<sup>32</sup>P-dT<sub>50</sub> の比活性 (cpm/mg) であり、Vは全容量対試料容量の容量比であり、Aは<sup>32</sup>P-dA溶液中に懸濁したビーズの平均活性 (cpm) であり、そしてTは<sup>32</sup>P-dT溶液中に懸濁したビーズの平均活性 (cpm) である。

当分野で習熟した者は他のビーズ、粒子、フイラメントなどを他のヌクレオチドコポリマーまたはホモポリマーと共に使用できることを認めるであろう。例えば、ポリA付加ビーズは (精製したdT<sub>10</sub> のEDA付加物の代わりに) 20mMリン酸ナトリウム (pH 7.6) 50m1中にポリA (MW>100,000) 100mgを含有する溶液を使用することにより製造された。

#### E.標的捕獲法

ビーズ調製物は標的ポリヌクレオチドを捕獲するために使用した。回収可能な支持体および可逆的捕獲を証明する一般的な実験標的捕獲法を以下に説明するが、例示目的のために (制限するものではない) 第1プローブA483および第2プローブA532を使用してその捕獲法を論じるであろう。第1プローブA483は<sup>32</sup>P-dCTPおよび<sup>32</sup>P-dGTPを用いて約10<sup>10</sup>dpm/mgの比放射能ヘランダムに3'末端標識した。第2プローブA532は酵素ターミナルトランスクレアーゼを用いて約70個の末標識dA残基を尾部に付加した。

まず初めに、標識プローブA483 200μg/m1と尾部付加プローブA532 400μg/m1は、いろいろな量のエンテロトキシン遺伝子の熱変性した475mer Xba I-Hind III 制限フラグメントと1.4M塩化ナトリウム中65°Cで15分間混合した。

次に、標的捕獲は標的とプローブ成分を含む媒体を、dT<sub>10</sub>-磁性ビーズ (磁性ビーズに対する非特異的結合を減じるためのプレハイブリダイゼーション後に3μg/mlのdA<sub>50</sub> 結合能をもつビーズ) のアリコートと接触させることにより開始した。磁性ビーズとプローブ-標的複合体は5m1ポリプロピレンチューブ中でプレハイブリダイゼーション緩衝液0.1m1と共に室温で2~5分間インキュベーションした。

チューブはコーニング (Corning) チューブ磁気分離機に配置した。コーニングチューブ磁気分離機は活性化されると、ポリプロピレンチューブを通して磁場を印加し、その磁場により磁性ビーズがチューブ内壁に固定化される。磁性ビーズがポリプロピレンチューブの側壁に固定化されているうちに、もとの媒体を取り出して捨てた。

固定化されている間に、ビーズは消泡剤としてイソアミルアルコールを含むプレハイブリダイゼーション緩衝

液0.6mlずつで3回洗浄した。プレハイブリダイゼーション緩衝液の添加後、チューブを磁場から移動させ、その媒体を激しく渦巻き混合することによりビーズを再懸濁させた。

次に、磁場を再度印加してビーズを固定化させ、プレハイブリダイゼーション緩衝液を捨てた。プレハイブリダイゼーション緩衝液の添加、ビーズの再懸濁、ビーズの固定化、およびプレハイブリダイゼーション緩衝液の除去から成るサイクルは2回繰り返した。ビーズに保持された標的一プローブ複合体は検出、バツクグラウンド捕獲または異なる標的捕獲サイクルの追加工程を含めたその後の処理のために利用可能である。

好適な標的捕獲法は標的一プローブ複合体の放出および第2支持体への再捕獲を包含する。好ましくは、その支持体は第1支持体と化学的に異なるものである。

標的一プローブ複合体の放出は次の一般方法により行われる。最後のプレハイブリダイゼーション緩衝液の除去後、ビーズを含むチューブにプレハイブリダイゼーション緩衝液を加えた。ビーズは攪拌下に60°Cで1~2分間インキュベーションして、ビーズからプローブー標的複合体を放出させた。温度を60°Cに維持したままで再び磁性分離機を活性化させ、遊離の標的一プローブ複合体を含む溶出液をチューブから分離した。その溶出液は別の回収可能支持体上に再捕獲されるか、または通常の支持体上での最終捕獲に付される。当分野で習熟した者は、標的一プローブ複合体の回収可能支持体（例えば本実施例の磁性ビーズ）への捕獲およびその支持体からの放出がハイブリダイゼーションのバツクグラウンドを低下させるために所望回数反復し得ることを認めるであろう。

標的一プローブ複合体の最終捕獲は、一般にdT-3000を非特異的に結合させた又は共有結合させたニトロセルロースフィルターまたはナイロン膜上で実施された。従つて、磁性ビーズに担持された標的一プローブ複合体は、そのビーズをプレハイブリダイゼーション緩衝液中60°Cで2分間加熱することにより、磁性ビーズから放出させた。ビーズを固定化し、溶出液を分離し、0.2ミクロンのアクリオディスク（ゲルマン社製）に通して磁性微粒子を除去した。dT-3000を保有するニトロセルロースフィルターは未標識プローブ上のdA尾部を選択し、結合し、捕獲した。

標的一プローブ複合体の最終捕獲のために化学的に異なる支持体を使用すると、前に使用した支持体に対して高い親和力を有するバツクグラウンド分子の結合が回避される。例えば、特定の支持体に対してもともと高い親和力を有する低レベルの汚染物質は、支持体と繰り返し結合してプローブ標的複合体と共に溶出されやすい。このような低レベル汚染物質は非常に異なる組成の支持体にそれらをさらすのと同程度に完全には同じ組成の回収可能支持体の反復使用により希釈されない。低レベル汚

染物質はまた化学的に異なる手段を用いて標的一プローブ複合体を支持体から放出させ、再捕獲することにより減少させることができる。

#### F. バツクグラウンド捕獲法

バツクグラウンド捕獲法はバツクグラウンドノイズを選択的に減少させて、標的の存在を示す真の信号の検出を可能にする。バツクグラウンド捕獲は單一プローブ系または2以上のプローブを使用する系に適用できる。例えば、単一プローブを特徴とするバツクグラウンド捕獲法において、そのプローブは標識成分とリガンドを含む。プローブは標的と結合することができ、リガンドはプローブが標的と結合していない時だけ支持体と安定した結合を形成することができる。

同様に、例えば、標的捕獲と関連して複数のプローブを特徴とするバツクグラウンド捕獲は2つのプローブを含む。第1の標的捕獲プローブ（第1支持体と結合し得る未標識リガンドを含む）は標的を捕獲するために使用され、そして第2のバツクグラウンド捕獲プローブ（検出可能な標識成分を含む）は第2バツクグラウンド支持体と結合し得る第2リガンドを有する。バツクグラウンド捕獲は検定の信号対ノイズのデータを高めるための標的捕獲に対する価値ある補足的方法である。

第1の標的捕獲プローブA532および第2のバツクグラウンド捕獲プローブA726ならびに標的エンテロトキシン遺伝子elt A1を使用する代表的なバツクグラウンド捕獲法について以下に説明する。当分野で習熟した者は、証明のために使用されるプローブが単に選択の問題であるにすぎないことを認めるであろう。他のプローブも当然使用できる。

プローブA532は初期標的捕獲のために磁性ビーズに共有結合されたdT<sub>10</sub>および最終標的捕獲のためにニトロセルロースに非特異的に結合させたdT<sub>3000</sub>と可逆的に結合しうる約100個のdA残基をその尾部に有していた。プローブA726はターミナルトランスフェラーゼを用いてその3'末端に約3個の<sup>32</sup>P-dCおよび<sup>32</sup>P-dG残基をランダム付加することにより標識した。プローブA726はそのプローブが標的とハイブリダイズしない場合にdC-セルロースと結合できる。

標的-第1および第2プローブ複合体を含有し且つ未結合第2プローブを含む可能性のある溶液はdC-セルロースと混合し、その混合物の温度を37°Cに維持した。この温度（37°C）はオリゴdCとdG<sub>7</sub>の解離温度よりも高く、標的-第1および第2プローブ複合体のdC-セルロースへの結合を防止する。この温度はまたオリゴdCとdG<sub>10</sub>の解離温度よりも低く、dG尾部をもつ未結合第2プローブのdC-セルロースへの結合を促進する。さらに、標的-第1および第2プローブ複合体は未結合第2プローブよりもdC-セルロース支持体へのその接近において著しく立体的に妨害される。第2プローブA726を含むdC-セルロースは遠心により除かれるが、当業者は過のよ

うな他の方法も同様に使用できることを認めるであろう。残留溶出液は標的ー第1および第2プローブ複合体と濃度の低下した未結合標識第2プローブA726を含有する。

#### G. 実施例

当分野で習熟した者は、回収可能支持体の製造、プローブの製造、標的捕獲およびバツクグラウンド捕獲のため的一般方法が特別な要求および目的に合うように変更しうることを認めるであろう。以下の実施例は特に指定しない限り上記に概略した一般的方法を包含する。

##### 実施例 1.

###### 磁性ビーズを使用する標的捕獲および検定

標的捕獲検定は2種のプローブと回収可能な磁性ビーズ支持体を用いて実施した。標的是エンテロトキシン産生遺伝子elt A1のXba I-Hind IIIフラグメントを含んでいた。第1プローブは磁性ビーズ支持体のdT<sub>10</sub>残基と結合しうる130個の非標識dA残基を尾部に付加したA532

30merオリゴヌクレオチドプローブであつた。第2プローブは第1プローブのハイブリダイゼーション位置から20ヌクレオチド下流で同じ標的に結合し得るA483 30merオリゴヌクレオチドプローブであつた。その第2プローブは30merオリゴヌクレオチドに<sup>32</sup>P-dCTPおよび<sup>32</sup>P-dGTPを末端付加して10<sup>10</sup> dpm/ $\mu$ gの比放射能することにより標識した。

末端付加した第1プローブと標識した第2プローブは1.4M塩化ナトリウム中でtox遺伝子の熱変性した457mer制限フラグメントの可変量と65°Cにて15分間インキュベーションした。非特異的に結合するバツクグラウンド対照として、末端付加第1プローブと標識第2プローブは標的の不在下に同一の溶液中でインキュベーションした。特異的に結合する対照として、さらに2つの反応混合物を調製した。第1の反応混合物は末端付加第1プローブと非標識第2プローブを含み、4  $\mu$ gの変性大腸菌DNAとインキュベーションした。第2の反応混合物は末端付加第1プローブと標識第2プローブを含み、標的DNA不含の同一反応混合物中で10  $\mu$ gの変性ヒトDNAとインキュベーションした。

15分のハイブリダイゼーション期間後、試料は0.75Mリン酸塩緩衝液(pH6.8) 0.7ml中でdT-付加磁性ビーズと5分間インキュベーションした。その後ビーズは磁的に固定化して前述の如く十分に洗浄した。標的ープローブ複合体は0.20Mリン酸塩緩衝液(pH6.8) 0.6ml中60°Cでビーズから溶出した。第1群のビーズをその溶出液および標的ープローブ複合体から分離した。第2群の磁性ビーズを溶出液に添加し、結合条件に至らしめて標的ープローブ複合体を再度捕獲させた。第2群のビーズを洗浄し、標的をビーズから再溶出して、溶出液からビーズを分離した。

第3群のビーズは標的ープローブ複合体を含む溶出液に加え、結合条件下に置いてビーズにもう一度標的ー

ロープ複合体を捕獲させた。その後ビーズを十分に洗浄し、前述の如く標的をビーズから溶出した。ビーズをその溶出液から分離し、溶出液は2mm四方のスロット中のdT<sub>3000</sub>ーナイロン膜を通して標的ープローブ複合体を捕獲させた。

dT<sub>3000</sub> ナイロン膜はハイブリースロット装置(hybrid-slot apparatus; ベトレスダ・リサーチ・ラボラトリ)を使用して2  $\mu$ gのdT<sub>3000</sub>をナイロンに共有結合させることにより作つた。簡単に述べると、dT<sub>3000</sub>(ライフ・サイエンス社製)は無塩トリス緩衝液中でGene-Screen<sup>TM</sup>(ニューアイジングランド・スクレア社製)のようなナイロン膜上に直接点在させた。その膜を室温で10分間乾燥し、次に赤外線ランプの下でさらに10分間乾燥した後、さらに10分間室温へ冷却した。ナイロン膜を備えたフィルター装置はUV-トランスイルミネーター(フォトダイン社製)上で上下逆にし、40uW/cm<sup>2</sup>で2分間UV光線に露光してdT<sub>3000</sub>をフィルターに架橋させた。

dT<sub>3000</sub> 膜は次の溶液をこの膜に順次通すことによりプレハイブリダイズさせた:

- 20 (1) 1% SDS;
- (2) 0.5% SDS中の0.5mg/ml BSA; および最後に
- (3) プレハイブリダイゼーション緩衝液

標的ープローブ複合体を含む可能性のあるdT<sub>3000</sub>ーナイロン膜は0.2Mリン酸ナトリウムおよび5mM EDTAで洗浄した。このナイロン支持体は第2プローブの<sup>32</sup>P標識成分の存在についてオーディオラジオグラフーで一晩監視した。オーディオラジオグラフー後、バンドをフィルターから切り取つてベースシンチレーション液体中で計数した。tox遺伝子を含む制限フラグメント3フェムトモル(10<sup>-15</sup>モル)を含むする溶液では2100および1400cpmのカウント数があつた。tox遺伝子を含む制限フラグメント30アトモル(10<sup>-18</sup>モル)を含むする試料は62cpmのカウント数があつた。

DNAを含まない第3試料は7cpmがあつた。10  $\mu$ gの熱変性したヒトDNAを含有する第4試料は0cpmがあつた。4  $\mu$ gの熱変性した大腸菌DNAを含有する第5試料は7cpmがあつた。この検定法の絶対感度は10<sup>-18</sup>モルのtox遺伝子であると推定された。標識された標的ー複合体の全回収効率はインプット(投入量)の1~2%であると推定された。この検定法は良好な特異性を立証した。DNAを全く含まない試料中に標識プローブが存在しないのと同様に、ヒトDNAまたは大腸菌DNAを含む試料中にも標識プローブは存在しない。実験プロトコールを繰り返すことにより、約5%の全標的捕獲効率が得られた。この方法はハイブリダイズされない標識プローブの初期レベル10<sup>11</sup>モルから約10<sup>4</sup>モルへバツクグラウンドを減少させた。バツクグラウンドの減少は捕獲効率の減少を十分以上に補償する7ログ(log)の改善を示す。

##### 実施例 2.

本実施例はバツクグラウンド捕獲と共に標的捕獲を特

微とする。標的およびバツクグラウンド捕獲は標的捕獲の處で述べた非標識の第1標的捕獲プローブA532、および標識された第2バツクグラウンド捕獲プローブA726を使用して行つた。

まず初めに、160ng/mlのdT-末端付加A532と40ng/mlの<sup>32</sup>P-標識プローブA726を混合してプローブ混合物を調製した。このプローブ混合物を可変量のエンテロトキシン産生遺伝子を含む細菌抽出物5μに加えた。抽出物-プローブ混合物は22°Cで15分間インキュベーションした。

15分のハイブリダイゼーション期間後、試料を10倍容量のプレハイブリダイゼーション緩衝液で希釈し、0.75Mリン酸塩緩衝液(pH6.8)0.7ml中でdT-付加磁性ビーズと共に5分間インキュベーションして標的捕獲を行つた。ビーズを磁気的に固定化して十分に洗浄した。標的-第1/第2プローブ複合体を前述の如く第1支持体から溶出し、第1支持体を除去した。

次に、標的-第1/第2プローブ複合体を含みまた未結合表

合の第2プローブを含む可能性のある溶出液はdC-セルロースと混合し、混合物の温度を37°Cに維持した。この温度(37°C)はオリゴdCとdG<sub>10</sub>の解離温度よりも高く、そのために標的-第1/第2プローブ複合体がdC-セルロースに結合するのを防止する。この温度はまたオリゴdCとdG<sub>10</sub>の解離温度よりも低く保たれ、そのためdG<sub>10</sub>尾部をもつ未結合第2プローブがdC-セルロースに結合するのを促進する。標的-第1/第2プローブ複合体はdC-セルロース支持体への接近において未結合第2プローブよりも著しく立体的に障害を受ける。dC-セルロースは遠心により分離されたが、当業者は過のような他の方法も同様に使用しうることを認めるであろう。

残存する溶出液は0.2ミクロンのアクロディスク(ゲルマン社製)を通して磁性微粒子およびセルロース微粒子を除去した。その後、溶出液は22°CでdT<sub>3000</sub>を含むニトロセルロースフィルターに通した。ニトロセルロースにより最終標的捕獲を実施した。

下記の表2はバツクグラウンド捕獲の適用を示す:  
2

工程	信号(cpm)	ノイズ(cpm)
----	---------	----------

## 第1実験

標的捕獲前	(不明)	2 0 0,0 0 0
標的捕獲後	1 0 5 8	2 3 1
バツクグラウンド捕獲後	4 9 5	2 5
戻過後	3 9 5	< 1

## 第2実験

標的捕獲前	(不明)	4 0 0,0 0 0
標的捕獲後	1 5 8 8	6 4 2
バツクグラウンド捕獲後 (戻過工程は実施せず)	1 0 8 4	6 9

1cpm以下にノイズを減少させることにより、試料中の極少量の標的を検出することができる。

10<sup>-18</sup>モル程度に少ない量(これは臨床用途に必要とされる範囲内である)の標的も検出された。

1ラウンドの標的捕獲は約3ログのバツクグラウンドを除去した。1ラウンドのバツクグラウンド捕獲は、初回の標的捕獲で除去されなかつたバツクグラウンドを1ログ減少させた。過による最終標的捕獲(第2ラウンドの標的捕獲)は、初めの2工程のどちらによつても除去されなかつたバツクグラウンドを2ログ減少させた。標的およびバツクグラウンド捕獲法は独立して作用し、本実施例ではバツクグラウンドを約6ログまで減少させ

た。バツクグラウンド捕獲は、第1回目の標的捕獲後に行う場合、よりよく作用すると思われる。明らかに、バツクグラウンド捕獲は標的捕獲よりも試料中の不純物に対してより一層感受性である。

標的捕獲後にバツクグラウンド捕獲を併用することは、いずれか一方の単独使用に比べてより大きな利点をもたらす。

上記実施例は放射性標識成分について詳述したものであるが、本方法は非放射性標識成分を使用する検定法に対して多大な影響を及ぼしうることが期待される。特に、本方法は蛍光剤や化学ルミネッセンス剤のような発光標識成分に適用されるだろう。適当な蛍光標識には、

例えばフルオロセイン、ピレン、アクリジン、スルホローダミン、エオシン、エリスロシンおよびそれらの誘導体が含まれるが、これらに限定されない。適当な化学発光剤には、例えばミクロペルオキシダーゼ、ルミノール、イソルミノール、グルコースオキシダーゼ、アクリジニウムエステルおよびそれらの誘導体が含まれる。

### 実施例 3.

以下の実施例は非放射性標識成分およびスパイクした (spiked) 生物学的媒体からの多重ラウンドの標的捕獲を特徴とする。スパイクした生物学的媒体は医療現場で臨床的に得られる試料と似ている。

エンテロトキシン産生大腸菌および野生型大腸菌の細胞抽出物は前述のように調製した。臨床現場に類似した環境におけるtox遺伝子の検出感度を測定するために、トキシン産生菌の抽出物は前述の如く野生型大腸菌の抽出物で希釈した。

次の物質は匿名の提供者から得られた：すなわちヒト大便試料、牛乳、ヒト唾液、ヒトたん、ヒト全血、ヒト血清、ヒト尿およびヒト精液。これらの臨床型試料は10分間にわたり可溶化した。大便試料は固体であるために5M GuSCN、0.3Mトリス-HCl1 (pH7.4)、0.1M EDTA (pH 7)、1% β-メルカプトエタノールの溶液中で可溶化した。可溶化後、試料のアリコートを作り、各アリコートは既知量のトキシン産生大腸菌または野生型大腸菌のいずれかでスパイクした。この混合物はその後粗過 (crude filtration; バイオラツド・エコノカラム) に通して100°Cで5分間加熱した。

残りの試料はその性状がより液状であったので大便とは異なる方法で処理した。液状試料を固体のGuSCNに加えて最終濃度を5Mとした。固体のGuSCNはまた大便の場合と同じ最終濃度とするために、十分量のトリス-HC1、EDTAおよびβ-メルカプトエタノールを含んでいた。次に試料のアリコートを作り、各アリコートは既知量のトキシン産生大腸菌または野生型大腸菌でスパイクした。この混合物は粗過に通し、100°Cで5分間加熱した。

実施例3のプローブの作製は前の実施例と相違している。第1捕獲プローブはプラスミドpBR322を用いて作製された。このプラスミドはHha IおよびHae IIIで制限し、プラスミドフラグメントの末端にターミナルトランスフェラーゼを用いて約100個のdA残基を付加した。標的のプラスミドはpBR322と広範囲にわたって相同である（スパイサーおよびノーブル、JBC257、5716～5721を参照）。こうして、第1捕獲プローブは比較的大量にプラスミドpBR322の両鎖の多数のフラグメントから作製された。

第2標識プローブは標的のエンテロトキシン遺伝子と特異的に結合するように作られた。第2標識プローブはバクテリオファージM13mp18にクローニングされたelt A1遺伝子のEcoRI-Hind III制限フラグメントから作製さ

れた。大腸菌HB101にバクテリオファージを感染させ、中間対数期まで増殖させた。大腸菌を収穫し、バクテリオファージを単離した。バクテリオファージはベセスダ・リサーチ・ラボラトリーズから入手しうるストツク・ニツクトランスレーション・キットを用いてビオチニル化dCTP（エンゾ・バイオケミカルズ社製）でニツクトランスレーションを行った。約5%のヌクレオチドがビオチニルヌクレオチドで置換されて、ビオチン標識第2プローブを形成した。

プローブ混合物は20mMトリス-HCl (pH7.4) および2mM EDTA中で8 μg/mlの第2M13-toxプローブと4 μg/mlの第1dA付加プローブとを混合することにより調製した。このプローブ混合物は100°Cで10分間加熱してプローブを変性させた。

1容量のプローブ混合物は希釈段階の1容量の試料と混合してハイブリダイゼーション混合物を調製した。ハイブリダイゼーション混合物はハイブリダイゼーション条件下に57°Cで15分間維持した。その後、このハイブリダイゼーション混合物は10容量の遮断緩衝液（0.75Mリン酸ナトリウム、pH8、0.5%ウラリルサルコシンナトリウム、10mg/ml大腸菌DNA、0.5mg/mlウシ血清アルブミン（BSA；ヌクレオチド不含）およびmM EDTA）で希釈した。このハイブリダイゼーション混合物に前述の如く製造したdT<sub>10</sub>付加磁性ビーズを加えた。ハイブリダイゼーション条件を22°Cで約1分間維持した。その後、ビーズを磁気的に固定化することにより、ハイブリダイゼーション混合物から分離した。ビーズは15分の間に2回洗浄して生物学的試料中の不純物とハイブリダイズされなかつたビオチン標識第2プローブを除去した。

30 次に、約1分間で、第1/第2プローブー標的複合体を遮断緩衝液中65°Cで磁性ビーズから溶出した。溶出液と第1ビーズを分離した。

約7分間で、第1/第2プローブー標的複合体は第2群のビーズに可逆的に結合させ、その後再び解離させた。第2群のdT<sub>10</sub>付加ビーズを希釈溶出液に加え、ハイブリダイゼーション条件を22°Cで約1分維持した。その後ビーズを洗つて遮断緩衝液中に再懸濁した。そのビーズ遮断緩衝液混合物を65°Cに高めて第1/第2プローブー標的複合体を放出させた。

40 5分間にわたり、ニトロセルロース上で第1/第2プローブー標的複合体の最終捕獲を実施した。第2ビーズからの溶出液はゲルマン・アクロディスク（0.2ミクロン）を通過させた。その後、dT<sub>3000</sub>ニトロセルロースフィルター（遮断緩衝液でプレハイブリダイズしたもの）に22°Cで第1/第2プローブー標的複合体含有溶出液を通過させた。

約30分間で、フィルターは第2プローブのビオチン標識を検出すべくさらに処理した。検出に使用した緩衝液の組成を以下の表3に示す。

## 表 3

検出用緩衝液

緩衝液 番 号	組 成
1	1 M NaCl、0.1 M トリス-HCl (pH 7.4)、5 mM MgCl <sub>2</sub> 、0.1 % ツイーン20
1a	5 mg/ml BSA、10 μg/ml 大腸菌DNA を含む緩衝液 16 l
2	5 % BSA、0.5 % ツイーン20 を含む緩衝液 16 l
3	0.1 M NaCl、0.1 M トリス-HCl (pH 9.5)、50 mM MgCl <sub>2</sub>

まず初めに、第1/第2プローブ一標的複合体を保有するフィルターは検出緩衝液No.2中で約5分間インキュベーションした。次に、フィルターは検出緩衝液No.1a中のストレプトアビジンーアルカリ性ホスファターゼ(ベセスダ・リサーチ・ラボラトリーズ)の1:200希釈物中で5分間インキュベーションした。その後、フィルターは検出緩衝液No.1で1分間に3回洗浄し、次いで検出緩衝液No.3で1分間に2回洗浄した。

次に、5-ブロム-4-クロル-3-インドリルホスフェート(BCIP)およびニトロブルー・トラゾリウム

(NBT)(キールケガード・アンド・ペリー社製)を検出緩衝液No.3で12倍に希釈し、0.2ミクロンのアクロディスクを通して過した。希釈したBCIP/NBT溶液をフィルターに加え、37°Cで15分間発色させた。

次に、フィルターは50mMトリス-HCl(pH7.4)および10mM EDTA中で1分間インキュベーションして反応を停止させた。感度はフィルター上で視覚的に、またはCS930(島津サイエンティフィック社製)でデンシトメーター走査することにより測定した。

本法の工程を以下の表4に示す。

表 4

経過時間

工程数	所要時間 (分)	累積時間 (分)
1. 生物学的試料の溶解； <i>D N A</i> の変性	1 0	1 0
2. 標識プローブと非標識プローブを加える；溶液中 5 7 °Cでハイブリダイゼーションを行なう	1 5	2 5
3. 磁性ビーズ上にプローブ-標的複合体を捕獲する	1	2 6
4. 磁性ビーズを洗浄して生物学的試料中の不純物およびハイブリダイゼーションバックグラウンドを除去する	1 5	4 1
5. プローブ-標的複合体を溶出する	1	4 2
6. 第2群のビーズを用いて工程3-5を繰り返す (但し洗浄を省く)	7	4 9

43

44

7. プローブ - 標的複合体を  
 $dT_{3000}$  - ニトロセルロ  
 ースへ結合させる 5 5 4
8. フィルターを遮断緩衝液  
 中でインキュベーション  
 する 5 5 9
9. ストレプトアビシン - ア  
 ルカリ性ホスフアターゼ  
 を結合させる 5 6 4
10. 洗浄 5 6 9
11. 染料を添加して酵素を検  
 出する 1 5 8 4
12. 反応を止める 1 8 5

表4は経過時間が1時間を越える例を説明したが、本法は変更が可能であり、より短い時間で行うことができる。匹敵する感度の非放射性プローブ検定は12時間～7

日を要し、大量の試料調製物を必要とする。  
 本検定法の感度を以下の表5に示す。

表 5  
感 度 水 準

生物学的試料	ハイブリダイゼーション混合物中の濃度	細菌数
細菌抽出物単独		1500
ヒト大便	2.5% (w/v)	2000
牛乳	12.5% (v/v)	3000
ヒト唾液	12.5% (v/v)	3000
ヒト尿	12.5% (v/v)	9000
ヒト精液	2.5% (v/v)	9000
ヒト血液	12.5% (v/v)	9000
ヒト血清	12.5% (v/v)	9000
ヒト痰	12.5% (v/v)	9000

本法は感度を改善するためにさらに改変することができる。例えば、多段捕獲放出サイクルにおいて熱溶出および化学的溶出を併用することにより、単一溶出、多段熱溶出単独または多段化学的溶出単独に比べて信号対ノイズの比が5倍以上高まるであろう。

同じ放出法または溶出法を使用すると、支持体から同じバツクグラウンドを放出させる傾向がある。しかしながら、異なる放出条件を使用すると、他の方法では溶出されやすいバツクグラウンドが支持体に保持される傾向がある。バツクグラウンドは2つの物理的または化学的に異なる条件下で標的に対して全く同様にふるまうとは考えられない。

磁性ビーズ上の標的一プローブ複合体の代表的な化学溶出法は、ビーズを3M GuSCNと室温で1分間接触させることである。熱溶出の例は先に説明した。

細菌を検出する能力はまたプローブをリボソームRNA配列に向けることにより改善されるであろう。リボソームRNA配列はゲノムDNAや臨床上重要なプラスミドDNAと比較したとき細胞当たりの標的の1000倍増加を与える。

こうして、本発明は標的捕獲およびバツクグラウンド減少ならびにアフィニティ検定を実施するための装置を特徴とする。好適な実施態様を例示し説明してきたが、本発明は変更および修飾が可能であり、従つて説明した細部に限定されるべくなく、特許請求の範囲に含まれるこのような変更および修飾も本発明に包含されるべきである。

#### 【図面の簡単な説明】

第1a図および第1b図は本発明の好適な検定法の手順を示す模式図である。

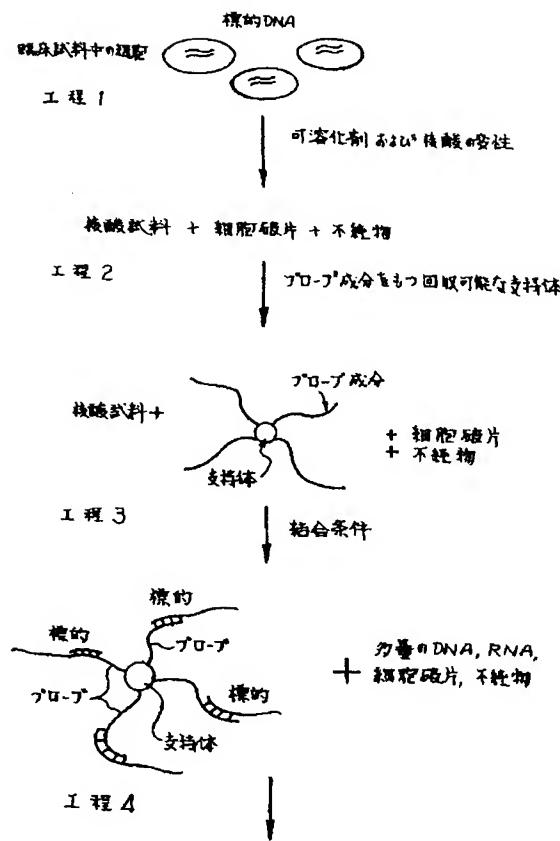
第2a図および第2b図は本発明の多重プローブ検定法の手順を示す模式図である。

第3図は第2a図および第2b図に示した本検定法の変法を示す模式図である。

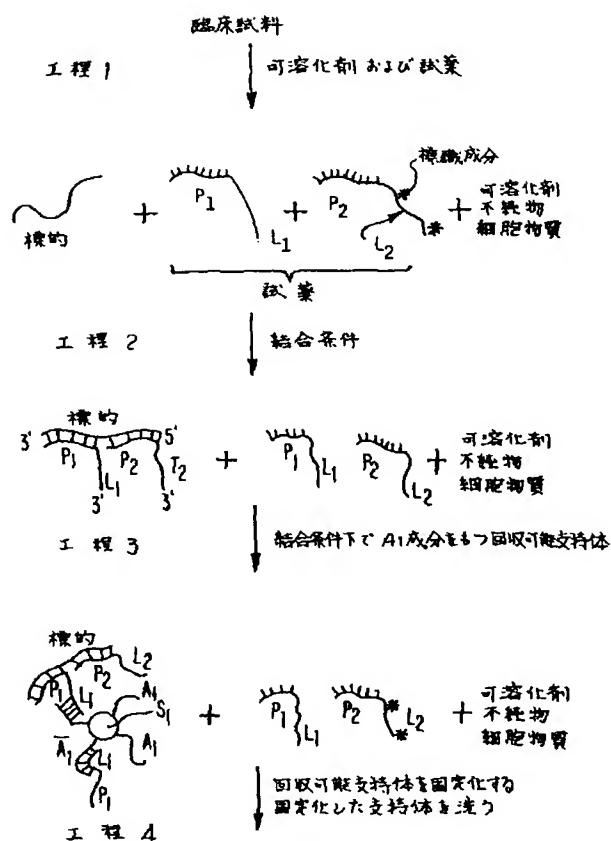
第4図は本検定法を実施するための装置を示す模式図である。

第5図はプローブ合成のための構築マップを示す模式図である。

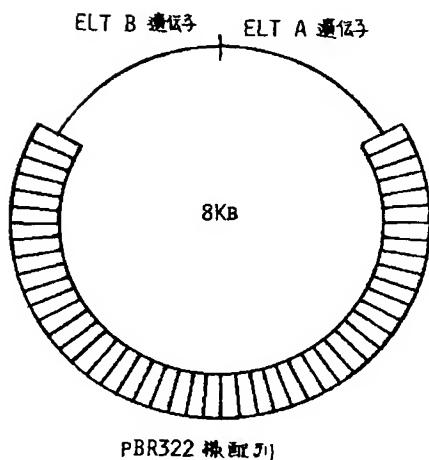
【第1 a図】



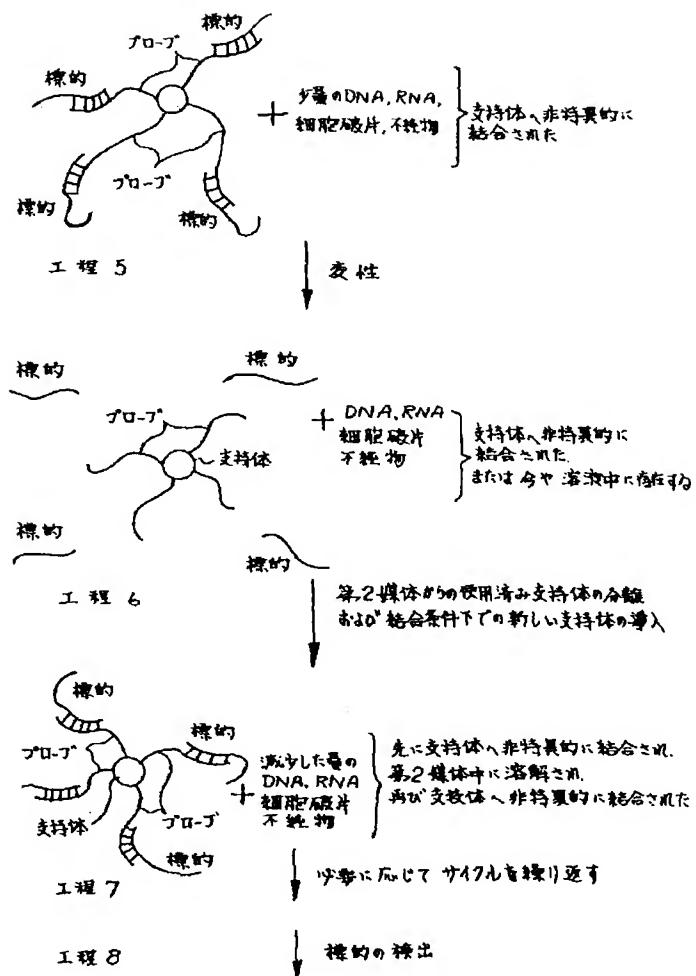
【第2 a図】



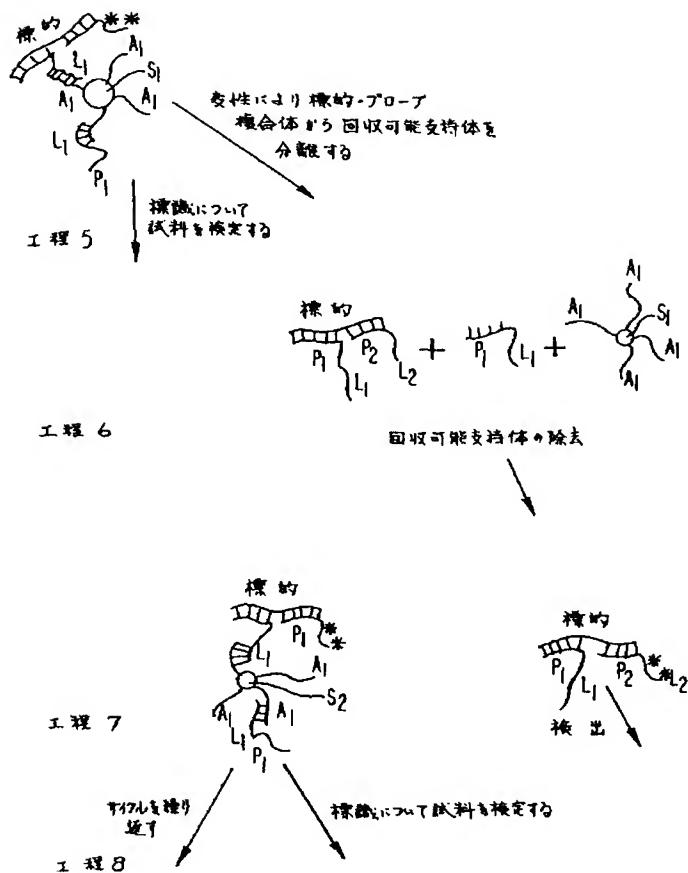
【第5図】



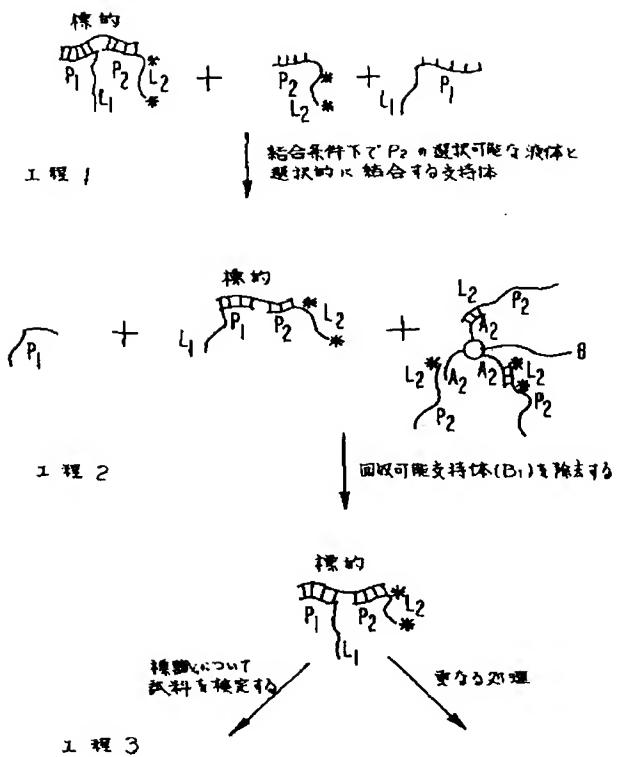
【第1b図】



【第2b図】



【第3図】



【第4図】

